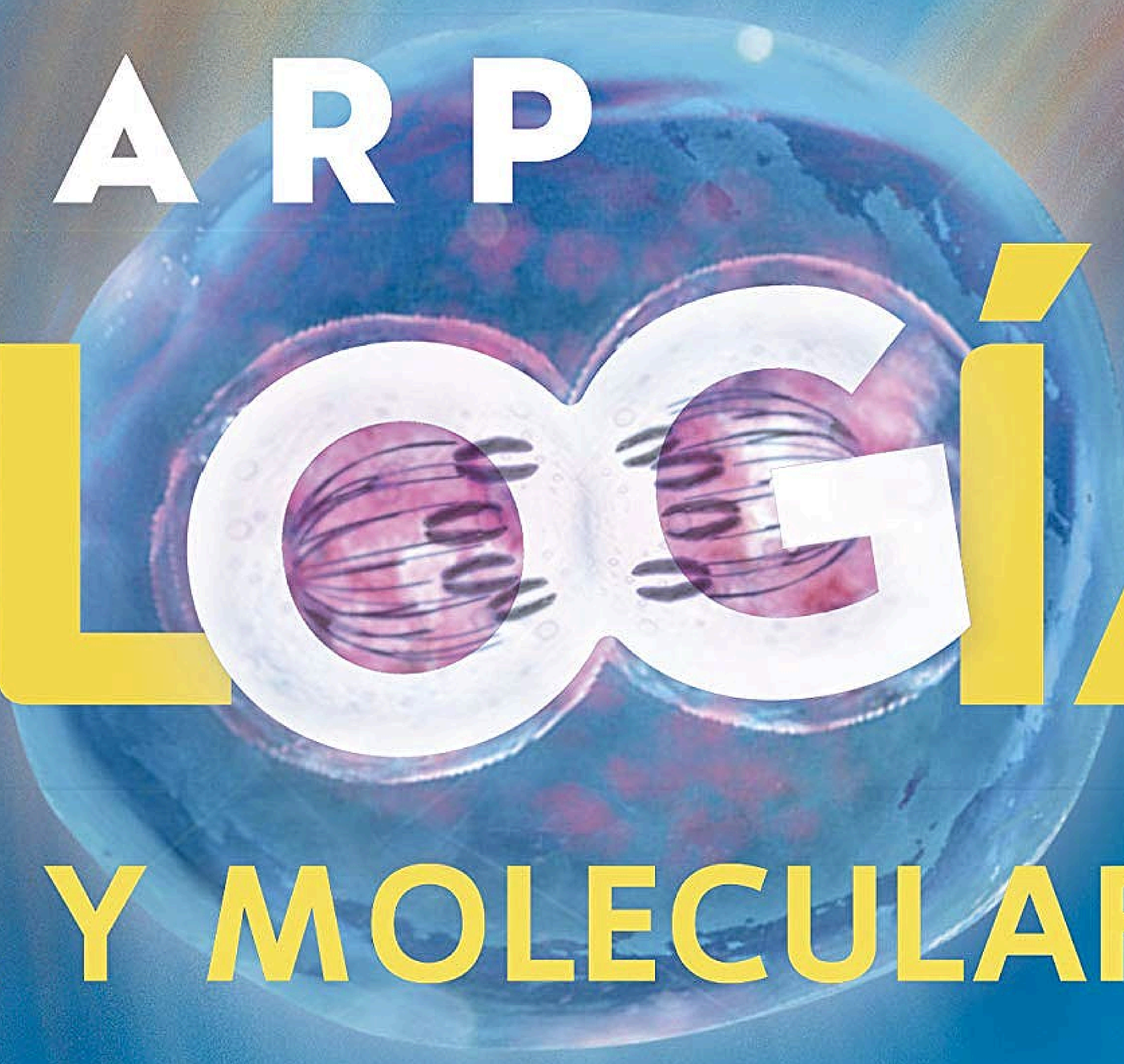
OCTAVA EDICIÓN

KARP

# BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



## Conceptos y Experimentos

Jannet Iwasa

McGraw Hill Education

OCTAVA EDICIÓN

# KARP
# BIOLOGÍA
## CELULAR Y MOLECULAR
### Conceptos y experimentos

**Janet Iwasa**
**Wallace Marshall**

Mc Graw Hill

MÉXICO · AUCKLAND · BOGOTÁ · BUENOS AIRES · GUATEMALA · LONDRES
MADRID · MILÁN · MONTREAL · NUEVA DELHI · NUEVA YORK · SAN FRANCISCO
SAN JUAN · SANTIAGO · SAO PAULO · SIDNEY · SINGAPUR · ST. LOUIS · TORONTO

**Publisher, Medical Content, MHE International and Professional:** James Shanahan
**Director General de Latinoamérica:** Martín Chueco
**Director Editorial:** Hans Serrano
**Gerente de Portafolio de Salud:** Víctor López Suero
**Editora de Desarrollo:** Jahel Merediz
**Gerente de Preprensa:** José Palacios
**Supervisión de Producción:** Zeferino García García
**Servicios Editoriales:** Miramar Outsourcing

**NOTA**

La medicina es una ciencia en constante desarrollo. Conforme surjan nuevos conocimientos, se requerirán cambios de la terapéutica. El (los) autor(es) y los editores se han esforzado para que los cuadros de dosificación medicamentosa sean precisos y acordes con lo establecido en la fecha de publicación. Sin embargo, ante los posibles errores humanos y cambios en la medicina, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación de la obra garantizan que la información contenida en ella sea precisa o completa, tampoco son responsables de errores u omisiones, ni de los resultados que con dicha información se obtengan. Convendría recurrir a otras fuentes de datos, por ejemplo, y de manera particular, habrá que consultar la hoja informativa que se adjunta con cada medicamento, para tener certeza de que la información de esta obra es precisa y no se han introducido cambios en la dosis recomendada o en las contraindicaciones para su administración. Esto es de particular importancia con respecto a fármacos nuevos o de uso no frecuente. También deberá consultarse a los laboratorios para recabar información sobre los valores normales

OCTAVA EDICIÓN

KARP
BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR
Conceptos y experimentos

*Todos los derechos reservados. Esta publicación no puede ser reproducida, ni parcial, ni totalmente, ni registrada en/o transmitida por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni formato, por ningún medio, sea mecánico, fotocopiado, electrónico, magnético, electroóptico, o cualquier otro, sin el permiso previo y por escrito de la editorial.*

DERECHOS RESERVADOS © 2014, 2011, 2009, 2006, 2003 respecto a la quinta edición en español por,
McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
Prolongación Paseo de la Reforma 1015, Torre A, Piso 16
Colonia Desarrollo Santa Fe,
Alcaldía Álvaro Obregón
C.P. 01376, Ciudad de México
Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana, Reg. Núm. 736

**ISBN: 978-1-4562-6922-7**
ISBN: 978-607-15-1137-9 (edición anterior)

**Traducción:** Miramar Outsourcing
**Diseño de portada:** Factor 02

Translated from the eight English edition of: Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments
Copyright © 2018, 2013, 2010, 2008, 2005, 2002 by John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved
ISBN: 978-1118-20673-7
ISBN: 978-1118-30179-1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 XXX 24 23 22 21 20 19

Impreso en México *Printed in Mexico*

# Asesora para la revisión científica de la edición en español

**Dra. Georgina del Carmen Filio Rodríguez**
Catedrática investigadora
Doctorado y maestría en Inmunología
Especialidad en Hematopatología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Inmunología Molecular II
Instituto Politécnico Nacional, México

# Sobre los autores



**JANET IWASA** es miembro del profesorado del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Utah. Recibió su licenciatura en el Colegio Williams y un Ph.D. en Biología Celular en la Universidad de San Francisco en California, donde se interesó por primera vez en la visualización de procesos biológicos. Como becaria posdoctoral, recibió una beca de la Fundación Nacional para la Ciencia para crear una exhibición multimedia con el Premio Nobel Jack Szostak (Universidad de Harvard) y el Museo de Ciencia de Boston. Más tarde se unió a la Facultad de Medicina de Harvard, como miembro de la facultad en el Departamento de Biología Celular, donde utilizó herramientas de visualización para ayudar en la comunicación científica, la exploración y la divulgación. Las galardonadas ilustraciones y animaciones de Janet han aparecido en revistas científicas como *Nature, Science and Cell,* así como en el *New York Times*.



**WALLACE MARSHALL** es profesor de Bioquímica y Biofísica en la Universidad de California, San Francisco (UCSF). Natural de Long Island, realizó su licenciatura en Ingeniería Eléctrica y Bioquímica en la Universidad Estatal de Nueva York, en Stony Brook, y su Ph.D. en Bioquímica en la UCSF, donde estudió la organización de cromosomas dentro del núcleo con John Sedat. Luego se trasladó a la Universidad de Yale para realizar estudios posdoctorales con Joel Rosenbaum, donde se interesó en los asuntos del control de tamaño de organelos y la organización celular, con el uso de cilios, flagelos y centriolos como sistemas modelo. En 2003 se unió a la facultad en la UCSF, donde continúa el estudio de cuestiones de organización celular en una variedad de organismos modelos, incluyendo algas verdes, levaduras, ciliados y células de mamíferos. Además de su investigación en biología celular, el Dr. Marshall enseña Metabolismo Humano en la Facultad de Farmacia de la UCSF, Biología Celular en la División de Graduados de la UCSF, y lleva a cabo un curso de laboratorio de dos semanas sobre el comportamiento celular. En 2014, se desempeñó como presidente de la comisión organizadora de la reunión anual de la Sociedad Americana de Biología Celular. En la actualidad es codirector del curso de verano de Fisiología en el laboratorio de biología marina en Woods Hole, Massachusetts.

# Prefacio a la octava edición

Durante las últimas dos décadas, el Dr. Gerald Karp ha escrito *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Durante este tiempo ha mantenido un enfoque consistente al combinar el rigor con la accesibilidad, de modo que incluso los estudiantes sin formación previa en biología celular, biología molecular o bioquímica han podido aprender biología celular, no solo como una recopilación de datos, sino como un proceso de descubrimiento. El valor de este enfoque es que las lecciones aprendidas se extienden mucho más allá del campo de la biología celular, y proporcionan una manera para que los estudiantes aprendan cómo funciona la ciencia, cómo los nuevos experimentos pueden anular los dogmas anteriores, y cómo las nuevas técnicas pueden conducir a un descubrimiento innovador. Este enfoque hace que la biología celular cobre vida.

Después de siete ediciones, el Dr. Karp está listo para pasar a otras aventuras. Estamos entusiasmados por haber asumido el desafío de continuar el enfoque único del Dr. Karp para la enseñanza de la biología celular, mientras continuamos dando prioridad a los estudiantes primero. Nuestro objetivo para esta revisión fue basarnos en el enfoque experimental distintivo de Karp, con el aporte de nuestras propias perspectivas únicas y el provecho de la tecnología actual. Con nuestra nueva función ***Ensayo experimental***, disponible en WileyPLUS Learning Space, los alumnos pueden ver de primera mano cómo se realizan las técnicas experimentales clave en el laboratorio. Estos ofrecen una combinación de videos —que muestran cómo los investigadores llevan a cabo los experimentos—, y animaciones en 3D –que muestran una vista a nivel molecular de cómo funcionan los experimentos–. Estos tutoriales brindan contexto y una explicación visual que ayuda a que estas importantes técnicas experimentales sean más concretas.

Una sólida comprensión de los conceptos cuantitativos se está volviendo cada vez más importante dentro de la biología celular, aunque es un área con la que muchos estudiantes luchan. Para abordar este problema también hemos agregado en soporte audiovisual los llamados ***Tutoriales cuantitativos*** para ilustrar visualmente cómo resolver preguntas analíticas específicas al final de cada capítulo. El tutorial cuantitativo proporciona una revisión, accesible y amigable para los estudiantes, de los conceptos matemáticos básicos utilizados en el contexto de un problema biológico, y ampliará los recursos disponibles para los conceptos cuantitativos y físicos en esta 8ª edición.

Una característica clave de las ediciones pasadas fue destacar cómo la biología celular impacta nuestra vida diaria, en términos de la medicina y otras áreas de la sociedad. Las secciones ***Perspectivas humanas*** destacan historias de interés humano para reforzar y revisar la biología celular básica, y también proporcionan ejemplos de cómo los descubrimientos fundamentales han progresado dentro de la práctica clínica. Hemos ampliado esta característica para que ahora cada capítulo tenga al menos una sección de Perspectivas humanas. Como parte de esta característica, informamos sobre los últimos ensayos clínicos para diversas terapias y medicamentos basados en la biología celular, una característica que esperamos inspire a los estudiantes que están siguiendo carreras en los campos de las ciencias de la salud. Además de las secciones completas de Perspectivas humanas, ahora cada capítulo se presenta con un breve "presentador de capítulos", diseñado en cada capítulo para generar entusiasmo sobre la ciencia, mediante temas o preguntas motivadoras. Esperamos que esto les brinde a nuestros lectores la oportunidad de pensar más sobre los vínculos entre la ciencia, la sociedad y nuestro lugar en el universo.

Trabajar en la 8a. edición junto al Dr. Karp ha renovado nuestra admiración por su escritura y su capacidad para realizar un seguimiento de la vanguardia en toda la gama de temas que comprenden la biología celular y molecular. En esta y futuras ediciones de *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos* nos dedicamos a llevar a cabo la misión original del Dr. Karp de proporcionar un texto interesante, moderno y legible que se basa en el enfoque experimental. Sus ideas y retroalimentación son bienvenidos a medida que continuamos nuestro trabajo en este texto, así que siéntase libre de contactarnos.

Janet Iwasa (jiwasa@gmail.com)
Wallace Marshall (Wallace.Marshall@ucsf.edu)

## WileyPLUS Learning Space

WileyPLUS Learning Space conecta el texto a ejemplos de medios cuidadosamente seleccionados tales como videos, animaciones y diagramas, y proporciona a los estudiantes una multitud de herramientas y contenido para el autoaprendizaje y la práctica. Los instructores pueden personalizar el contenido de su curso para los estudiantes, crear tareas en línea y cuestionarios, y tener una idea de la actividad de los estudiantes a través del análisis de datos y las funciones de informes. Para probarlo, visite http://www.wileypluslearningspace.com. Estos son algunos de los recursos disponibles en WileyPLUS Learning Space:

- Videos tutoriales experimentales
- Videos tutoriales cuantitativos
- Animaciones de vistas celulares
- Videoteca
- Animaciones básicas de biología
- Manual del instructor por Joel Piperberg, Millersville University
- Preguntas clicker por Leocadia Paliulis, Bucknell University y Omar Quintero, Universidad de Richmond
- Conferencia sobre presentaciones de PowerPoint por Edmund B. Rucker, Universidad de Kentucky
- Banco de preguntas y respuestas clave por Robert Seiser, Roosevelt University

## RECONOCIMIENTOS

Gerald Karp, quien dedicó muchos años a pensar, escribir y editar completa y cuidadosamente este texto, ha dejado un legado notable que estamos agradecidos de heredar. Al preparar esta edición deseamos agradecer su perspicacia, sabiduría y consejos que siempre nos fueron brindados con entusiasmo y generosidad.

Les estamos agradecidos a muchas personas en John Wiley & Sons que hicieron posible esta edición. Kevin Witt nos condujo en las etapas iniciales y nos infundió su entusiasmo para llevar a cabo este proyecto. Bonnie Roth brindó un soberbio liderazgo, orientación y apoyo durante todo el proceso de redacción y edición. Carrie Thompson, Melissa Edwards, Beth Pearson y Liz Baird nos ayudaron a mantenernos organizados y encaminados con el texto y los diversos elementos de los medios. Patty Donovan de SPI Global desempeñó un papel central en la coor-

dinación de la producción del texto, al incorporar cambios en el mismo, y numerosas ilustraciones e imágenes. Billy Ray dirigió al equipo en la obtención de nuevas imágenes utilizadas en esta edición. Maureen Eide diseñó hábilmente el interior y la portada.

Janet Iwasa agradece a Rob Savage, Dyche Mullins y Jack Szostak por inspirarla y guiarla en el camino para convertirse en bióloga. Janet está particularmente agradecida por el apoyo de su familia, Adam, Aki y Kenzo, y el estímulo que sus padres, Kuni y Mieko, le han dado durante toda la vida.

Wallace Marshall agradece a sus mentores científicos, Rolf Sternglanz, John Sedat y Joel Rosenbaum, por haberlo lanzado en la dirección correcta. Él agradece a sus padres, Clifford y Adele Marshall, por hacer de él quien es. Y agradece a su familia, Jennifer y Wyeth, por su continua inspiración y apoyo.

## También deseamos agradecer a todos los revisores de esta y otras ediciones anteriores:




STEVE ALAS
Universidad Politécnica del Estado de California, Pomona
RAVI ALLADA
Northwestern University
DEREK APPLEWHITE
Reed College
LINDA AMOS
MRC Laboratorio de Biología Molecular
KARL J. AUFDERHEIDE
Universidad Texas A&M
GERALD T. BABCOCK
Universidad Estatal de Michigan
WILLIAM E. BALCH
Instituto de Investigación Scripps
KENNETH J. BALAZOVICH
Universidad de Michigan
JAMES BARBER
Colegio Imperial de Ciencias—Laboratorios Wolfson
JOHN D. BELL
Universidad Brigham Young
WENDY A. BICKMORE
Medical Research Council, Reino Unido
ASHOK BIDWAI
Universidad de Virginia Occidental
ALLAN BLAKE
Universidad Seton Hall
MARTIN BOOTMAN
Instituto Babraham
DAVID BOURGAIZE
Whittier College
DANIEL BRANTON
Universidad de Harvard
THOMAS R. BREEN
Universidad del sur de Illinois
SHARON K. BULLOCK
Universidad de la Mancomunidad de Virginia
RODERICK A. CAPALDI
Universidad de Oregon
GORDON G. CARMICHAEL
Centro de salud de la Universidad de Connecticut
RATNA CHAKRABARTI
Universidad de Florida Central
KENT D. CHAPMAN
Universidad del Norte de Texas
K. H. ANDY CHOO
Hospital infantil real—El Instituto Murdoch
DENNIS O. CLEGG
Universidad de California—Santa Bárbara
KATE COOPER
Loras College
RONALD H. COOPER
Universidad de California, Los Ángeles
PHILIPPA D. DARBRE
Universidad de Reading
ROGER W. DAVENPORT
Universidad de Maryland
SUSAN DESIMONE
Middlebury College
LINDA DEVEAUX
Universidad Estatal de Idaho
RICHARD E. DEARBORN
Colegio de Farmacia de Albany
BARRY J. DICKSON
Instituto de Investigación de Patología Molecular
DAVID DOE
Westfield State College
ROBERT S. DOTSON
Universidad de Tulane
JENNIFER A. DOUDNA
Universidad de Yale
MICHAEL EDIDIN
Universidad Johns Hopkins
EVAN E. EICHLER
Universidad de Washington
ARRI EISEN
Universidad Emory
ROBERT FILLINGAME
Escuela de Medicina de la Universidad de Wisconsin
ORNA COHEN-FIX
Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Biología Molecular y Celular
JACEK GAERTIG
Universidad de Georgia
BENJAMIN GLICK
Universidad de Chicago
REGINALD HALABY
Universidad Estatal de Montclair
MICHAEL HAMPSEY
Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey
MICHAEL HARRINGTON
Universidad de Alberta
MARCIA HARRISON
Universidad de Marshall
R. SCOTT HAWLEY
Profesor de Investigación de la Sociedad Americana del Cáncer
REBECCA HEALD
Universidad de California, Berkeley
ROBERT HELLING
Universidad de Michigan
MARK HENS
Universidad de Carolina del Norte, Greensboro
ARTHUR HORWICH
Facultad de Medicina de la Universidad de Yale
JEN-CHIH HSIEH
Universidad Estatal de Nueva York en Stony Brook
JOEL A. HUBERMAN
Instituto del Cáncer Roswell Park
GREGORY D. D. HURST
Universidad de Londres
KEN JACOBSON
Universidad de Carolina del Norte
MARIE JANICKE
Universidad en Buffalo-SUNY
MICHAEL JONZ
Universidad de Ottawa
ROLAND KAUNAS
Universidad Texas A&M
HAIG H. KAZAZIAN, JR.
Universidad de Pennsylvania
LAURA R. KELLER
Universidad Estatal de Florida
TOM KELLER
Universidad Estatal de Florida
REBECCA KELLUM
Universidad de Kentucky
GREG M. KELLY
Universidad de Western Ontario
NEMAT O. KEYHANI
Universidad de Florida
KIM KIRBY
Universidad de Guelph
NANCY KLECKNER
Universidad de Harvard
WERNER KÜHLBRANDT
Instituto de Biofísica Max-Planck
JAMES LAKE
Universidad de California, Los Ángeles
CLAIRE M. LEONARD
Universidad William Paterson
ROBERT C. LIDDINGTON
Instituto Burnham
FE LIEBL
Universidad del sur de Illinois, Edwardsville
VISHWANATH R. LINGAPPA
Universidad de California—San Francisco
JEANNETTE M. LOUTSCH
Universidad Estatal de Arkansas
JON LOWRANCE
Universidad Lipscomb
MARGARET LYNCH
Universidad Tufts
CHARLES MALLERY
Universidad de Miami
MICHAEL A. MCALEAR
Universidad Wesleyan
ARDYTHE A. MCCRACKEN
Universidad de Nevada-Reno
THOMAS MCKNIGHT
Universidad Texas A&M
JOANN MEERSCHAERT
Universidad Estatal St. Cloud
JOHN MENNINGER
Universidad de Iowa
KIRSTEN MONSEN
Universidad Estatal de Montclair
ANDREW NEWMAN
Universidad de Cambridge
MICHELLE MORITZ
Universidad de California—San Francisco
ROBERT MORRIS
Wheaton College
ALAN NIGHORN
Universidad de Arizona
ROBERT M. NISSEN
Universidad Estatal de California, Los Ángeles
JONATHAN NUGENT
Universidad de Londres

VERONICA C. NWOSU
Universidad Central de Carolina del Norte
MIKE O'DONNELL
Universidad Rockefeller
GREG ODORIZZI
Universidad de Colorado, Boulder
LEOCADIA PALIULIS
Universidad Bucknell
JAMES G. PATTON
Universidad de Vanderbilt
HUGH R. B. PELHAM
MRC Laboratorio de Biología Molecular
JONATHAN PINES
Instituto Wellcome/CRC
DEBRA PIRES
Universidad de California, Los Ángeles
MITCH PRICE
Universidad del Estado de Pensilvania
CHARLES PUTNAM
Universidad de Arizona
DAVID REISMAN
Universidad de Carolina del Sur
DONNA RITCH
Universidad de Wisconsin-Green Bay
JOEL L. ROSENBAUM
Universidad de Yale
WOLFRAM SAENGER
Universidad Libre de Berlín
SHIVENDRA V. SAHI
Universidad de Western Kentucky
JAMIE SANFORD
Universidad del Norte de Ohio
JOSUÉ SANDQUIST
Grinnell College
PRASANNA SATPUTE-KRISHNAN
Instituto Nacional de Salud
INDER M. SAXENA
Universidad de Texas, Austin
RANDY SCHEKMAN
Universidad de California, Berkeley
SANDRA SCHMID
Instituto de Investigación Scripps
TRINA SCHROER
Universidad Johns Hopkins
TIM SCHUH
Universidad Estatal de St. Cloud
DAVID SCHULTZ
Universidad de Louisville
ROD SCOTT
Wheaton College
KATIE SHANNON
Universidad de Carolina del Norte-Chapel Hill
JOEL B. SHEFFIELD
Universidad de Temple
ERIC SHELDEN
Universidad Estatal de Washington
DENNIS SHEVLIN
College of New Jersey
JEFF SINGER
Universidad Estatal de Portland
ROGER D. SLOBODA
Dartmouth College
HARRIETT E. SMITH-SOMERVILLE
Universidad de Alabama
BRUCE STILLMAN
Laboratorio Cold Spring Harbor
ADRIANA STOICA
Universidad de Georgetown
ANN STURTEVANT
Universidad de Michigan-Flint
COLLEEN TALBOT
Universidad Estatal de California, San Bernardino
WILLIAM TERZAGHI
Universidad de Wilkes
GISELLE THIBAUDEAU
Universidad Estatal de Mississippi
JEFFREY L. TRAVIS
Universidad de Albany—SUNY
PAUL TWIGG
Universidad de Nebraska—Kearney
NIGEL UNWIN
MRC Laboratorio de Biología Molecular
AJIT VARKI
Universidad de California—San Diego
JOSE VAZQUEZ
Universidad de Nueva York
CLAIRE E. WALCZAK
Universidad de Indiana
PAUL E. WANDA
Universidad del sur de Illinois, Edwardsville
JENNIFER WATERS
Universidad de Harvard
CHRIS WATTERS
Middlebury College
ANDREW WEBBER
Universidad del Estado de Arizona
BEVERLY WENDLAND
Universidad Johns Hopkins
GARY M. WESSEL
Universidad de Brown
ERIC V. WONG
Universidad de Louisville
ANDREW WOOD
Universidad del sur de Illinois
GARY YELLEN
Escuela Médica de Harvard
MASASUKE YOSHIDA
Instituto de Tecnología de Tokio
DANIELA ZARNESCU
Universidad de Arizona
JIANZHI ZHANG
Universidad de Michigan
ROBERT A. ZIMMERMAN
Universidad de Massachusetts

# Contenido


## 1 Introducción al estudio de la célula y la biología molecular 1

1.1 Descubrimiento de las células 2
Microscopía 2
Teoría celular 3

1.2 Propiedades básicas de las células 3
Las células son altamente complejas y organizadas 3
Las células poseen un programa genético y los medios para usarlo 5
Las células son capaces de producir más de sí mismas 5
Las células adquieren y utilizan energía 5
Las células llevan a cabo una variedad de reacciones químicas 6
Las células participan en actividades mecánicas 6
Las células son capaces de responder a los estímulos 6
Las células son capaces de autorregularse 6
Las células evolucionan 7

1.3 Características que distinguen a las células procariotas y eucariotas 8

1.4 Tipos de células procariotas 13
Dominio Archaea y dominio Bacteria 13
Diversidad de las procariotas 14

1.5 Tipos de células eucariotas 15
Diferenciación celular 15
Organismos modelo 16

1.6 PERSPECTIVA HUMANA 17
**Perspectiva de la terapia de reemplazo celular** 17

1.7 Tamaños de las células y sus componentes 21

1.8 Virus y viroides 23

1.9 VÍAS EXPERIMENTALES 26
**Origen de las células eucariotas** 26

## 2 Las bases químicas de la vida 31

2.1 Enlaces covalentes 32
Moléculas polares y no polares 33
Ionización 33

2.2 PERSPECTIVA HUMANA 34
**¿Los radicales libres causan envejecimiento?** 34

2.3 Enlaces no covalentes 35
Enlaces iónicos: atracciones entre átomos cargados 35
Enlaces de hidrógeno 35
Interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals 36
Las propiedades del agua que mantienen la vida 37

2.4 Ácidos, bases y tampones 38

2.5 La naturaleza de las moléculas biológicas 39
Grupos funcionales 40
Una clasificación de moléculas biológicas por función 40

2.6 Carbohidratos 42
La estructura de azúcares simples 42
Estereoisomerismo 42
Unión de los azúcares 43
Polisacáridos 44

2.7 Lípidos 46
Grasas 46
Esteroides 47
Fosfolípidos 47

2.8 Bloques de construcción de proteínas 48
Las estructuras de los aminoácidos 49
Las propiedades de las cadenas laterales 50

2.9 Estructuras primarias y secundarias de las proteínas 53
Estructura primaria 53
Estructura secundaria 53

2.10 Estructura terciaria de las proteínas 55
Mioglobina: la primera proteína globular cuya estructura terciaria fue determinada 56
La estructura terciaria puede revelar similitudes inesperadas entre las proteínas 56
Dominios de proteínas 57
Cambios dinámicos dentro de las proteínas 58

2.11 Estructura cuaternaria de las proteínas 58
La estructura de la hemoglobina 59
Interacciones proteína-proteína 59

2.12 Plegamiento de las proteínas 60
Dinámica de plegamiento de las proteínas 60
El papel de los chaperones moleculares 62

2.13 PERSPECTIVA HUMANA 62
**El plegamiento incorrecto de las proteínas puede tener consecuencias mortales** 62

2.14 VÍAS EXPERIMENTALES 67

**Las proteínas que ayudan a los chaperones alcanzan su estado plegado correcto** 67

2.15 Proteómica e interactómica 71

Proteómica 71

Interactómica 72

2.16 Ingeniería de las proteínas 73

Producción de nuevas proteínas 74

Diseño de fármacos basada en la estructura 75

2.17 Adaptación y evolución de proteínas 76

2.18 Ácidos nucleicos 77

2.19 La formación de estructuras macromoleculares complejas 79

El ensamblaje de partículas del virus del mosaico del tabaco 79

El conjunto de subunidades ribosómicas 79

3 Bioenergética, enzimas y metabolismo **81**

3.1 Las leyes de la termodinámica 82

La primera ley de la termodinámica 82

La segunda ley de la termodinámica 83

3.2 Energía libre 85

Cambios de energía libre en las reacciones químicas 85

Cambios de energía libre en las reacciones metabólicas 86

3.3 Acoplamiento de reacciones endergónicas y exergónicas 88

3.4 Equilibrio *versus* metabolismo de estado estacionario 88

3.5 Las enzimas como catalizadores biológicos 89

Propiedades de las enzimas 90

Superación de la barrera de la energía de activación 90

El sitio activo 92

3.6 Mecanismos de la catálisis de enzimas 93

Orientación del sustrato 94

El cambio de la reactividad del sustrato 94

La inducción de tensión en el sustrato 94

3.7 Cinética de enzimas 97

El modelo Michaelis-Menten de la cinética de enzimas 97

Inhibidores enzimáticos 98

3.8 PERSPECTIVA HUMANA 100

**El creciente problema de la resistencia a los antibióticos** 100

3.9 Una descripción del metabolismo 103

Oxidación y reducción: un asunto de electrones 103

Captura y uso de la energía 103

3.10 Glucólisis y fermentación 105

Producción de ATP en la glucólisis 105

Oxidación anaeróbica del piruvato: el proceso de fermentación 108

3.11 Poder reductor 109

3.12 Regulación metabólica 109

Alteración de la actividad enzimática mediante la modificación covalente 109

La alteración de la actividad enzimática mediante modulación alostérica 110

3.13 Separación de las vías anabólica y catabólica 110

3.14 PERSPECTIVA HUMANA 111

**Restricción calórica y longevidad** 111

4 Estructura y función de la membrana plasmática **114**

4.1 Introducción a la membrana plasmática 115

Descripción general de las funciones de la membrana 115

Breve historia de los estudios sobre la estructura de la membrana plasmática 116

4.2 Composición lipídica de las membranas 118

Lípidos de membrana 119

Naturaleza e importancia de la bicapa lipídica 120

Asimetría de los lípidos de la membrana 121

4.3 Carbohidratos de membrana 122

4.4 Proteínas de membrana 123

Proteínas integrales de membrana 124

Proteínas periféricas de membrana 125

Proteínas de membrana ancladas a lípidos 125

4.5 Estudio de la estructura y propiedades de las proteínas integrales de membrana 126

Identificación de dominios transmembrana 127

Enfoques experimentales para identificar cambios de conformación dentro de una proteína integral de membrana 128

4.6 Lípidos de membrana y fluidez de la membrana 130

Importancia de la fluidez de la membrana 131

Mantenimiento de la fluidez de la membrana 131

Balsas lipídicas 131

4.7 Naturaleza dinámica de la membrana plasmática 132

Difusión de las proteínas de membrana tras la fusión celular 133

Restricciones sobre la proteína y la movilidad de los lípidos 133

4.8 El glóbulo rojo: un ejemplo de estructura de membrana plasmática 137

Proteínas integrales de la membrana de eritrocitos 137
El esqueleto de la membrana del eritrocito 137

4.9 Movimiento de solutos a través de las membranas celulares 139

Energética del movimiento de solutos 139
Formación de un gradiente electroquímico 140

4.10 Difusión a través de la bicapa lipídica 140

Difusión de sustancias a través de membranas 140
Difusión del agua a través de las membranas 141

4.11 La difusión de iones a través de membranas 143

4.12 VÍAS EXPERIMENTALES 147

**El receptor acetilcolina** 147

4.13 Difusión facilitada 151

4.14 Transporte activo 152

Transporte activo primario: transporte de acoplamiento a la hidrólisis del ATP 152
Otros sistemas primarios de transporte de iones 154
El uso de la energía luminosa para transportar iones activamente 155
Transporte activo secundario (o cotransporte): acoplamiento del transporte activo con los gradientes iónicos existentes 155

4.15 PERSPECTIVA HUMANA 157

**Defectos en los canales iónicos y transportadores como causa de enfermedades hereditarias** 157

4.16 Potenciales de membrana 159

El potencial de reposo 159
El potencial de acción 160

4.17 Propagación de los potenciales de acción como impulso 161

4.18 Neurotransmisión: el salto de la hendidura sináptica 162

Acción de fármacos en las sinapsis 165
Plasticidad sináptica 165

## 5 Las mitocondrias y la respiración aeróbica **168**

5.1 Estructura mitocondrial y función 169

Membranas mitocondriales 170
La matriz mitocondrial 172

5.2 Metabolismo aeróbico en la mitocondria 172

El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, *tricarboxylic acid*) 173
Importancia de las coenzimas reducidas en la formación de ATP 175

5.3 PERSPECTIVA HUMANA 177

**Función del metabolismo anaeróbico y aeróbico en el ejercicio** 177

5.4 La fosforilación oxidativa en la formación de la ATP 178

Potenciales oxidación-reducción 179
Transporte de electrones 180
Tipos de transportadores de electrones 180

5.5 Complejos de transporte de electrones 182

Complejo I (NADH deshidrogenasa) 184
Complejo II (succinato deshidrogenasa) 185
Complejo III (citocromo $bc_1$) 185
Complejo IV (citocromo *c* oxidasa) 185

5.6 Establecimiento de una fuerza protón motriz 186

5.7 La estructura de la ATP sintasa 187

5.8 El mecanismo de cambio de la fijación en la formación de ATP 189

Componentes de la hipótesis del cambio de la fijación 189
Evidencia para apoyar el mecanismo de cambio de la fijación y la catálisis rotativa 190

5.9 Usando el gradiente de protones 192

La función de la parte $F_o$ de la ATP sintasa en la síntesis de ATP 192
Otras funciones para la fuerza protón motriz, además de la síntesis de ATP 193

5.10 Peroxisomas 193

5.11 PERSPECTIVA HUMANA 195

**Enfermedades que resultan de una función mitocondrial o peroxisomal anormal** 195

## 6 La fotosíntesis y los cloroplastos **199**

6.1 El origen de la fotosíntesis 200

6.2 Estructura del cloroplasto 201

6.3 Una descripción del metabolismo fotosintético 202

6.4 La absorción de la luz 203

6.5 Coordinar la acción de dos sistemas fotosintéticos diferentes 205

6.6 Las operaciones del fotosistema II y el fotosistema I 207

Operaciones del PSII: obtención de electrones mediante la división del agua 207
Operaciones del PSI: la producción de NADPH 210

6.7 Una descripción general del transporte fotosintético de electrones 211

6.8 Fotofosforilación 212

6.9 Síntesis de carbohidratos en plantas $C_3$ 213
Control redox 215
Fotorrespiración 216
Peroxisomas y fotorrespiración 217

6.10 Síntesis de carbohidratos en plantas $C_4$ y plantas CAM 218

6.11 PERSPECTIVA HUMANA 219
**Calentamiento global y secuestro de carbono** 219

## 7 Interacciones entre las células y su entorno **222**

7.1 Resumen de interacciones extracelulares 223

7.2 Matriz extracelular 224

7.3 Componentes de la matriz extracelular 226
Colágeno 226
Proteoglucanos 228
Fibronectina 229
Laminina 229

7.4 Propiedades dinámicas de la matriz extracelular 231

7.5 Integrinas 231

7.6 Anclaje de células a su sustrato 234
Adhesiones focales 234
Hemidesmosomas 236

7.7 Interacciones de las células con otras células 237
Selectinas 238
La superfamilia de inmunoglobulinas 239
Cadherinas 239

7.8 PERSPECTIVA HUMANA 241
**La función de la adhesión celular en la inflamación y metástasis** 241

7.9 Uniones adherentes y desmosomas 244

7.10 Función de los receptores de adhesión celular en la señalización transmembrana 245

7.11 Uniones estrechas: sello del espacio extracelular 245

7.12 Uniones gap y plasmodesmos: mediación de la comunicación intercelular 247
Uniones gap 248
Plasmodesmos 250

7.13 VÍAS EXPERIMENTALES 251
**Función de las uniones gap en la comunicación intercelular** 251

7.14 Paredes celulares 254

## 8 Sistemas de membrana citoplásmica: estructura, función y tráfico de membranas **257**

8.1 Una descripción del sistema de la endomembrana 258

8.2 Algunos enfoques del estudio de las endomembranas 260
Conocimientos obtenidos de la autorradiografía 260
Conocimientos obtenidos a partir del uso de la proteína verde fluorescente 260
Conocimientos obtenidos del análisis de fracciones subcelulares 262
Información obtenida a partir del uso de sistemas sin células 263
Información obtenida del estudio de fenotipos mutantes 263

8.3 El retículo endoplásmico 265
El retículo endoplásmico liso 266
El retículo endoplásmico rugoso 267

8.4 Funciones del retículo endoplásmico rugoso 268
Síntesis de proteínas en ribosomas ligados a membranas *versus* libres 268
Síntesis de proteínas secretoras, lisosomales o vacuolar de las plantas 268
Procesamiento de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico 270
Síntesis de proteínas integrales de membranas en ribosomas unidos al ER 270

8.5 Biosíntesis de membrana en el retículo endoplásmico 271

8.6 Glucosilación en el retículo endoplásmico rugoso 273

8.7 Mecanismos que aseguran la destrucción de proteínas mal plegadas 275

8.8 Transporte vesicular del ER al Golgi 276

**8.9** El complejo de Golgi 276
Glucosilación en el complejo de Golgi 278
El movimiento de materiales a través del complejo de Golgi 278
**8.10** Tipos de vesículas de transporte 280
Vesículas recubiertas con COPII: transporte de carga desde el ER al complejo de Golgi 281
Vesículas recubiertas COPI: transporte de proteínas escapadas devueltas al ER 284
**8.11** Más allá del complejo de Golgi: clasificación de proteínas en el TGN 285
Clasificación y transporte de enzimas lisosomales 285
Clasificación y transporte de proteínas no lisosomales 286
8.12 PERSPECTIVA HUMANA 286
**Trastornos resultantes de defectos en la función lisosomal** 286
**8.13** Dirigir vesículas a un compartimiento particular 288
**8.14** Exocitosis 290
**8.15** Lisosomas 291
**8.16** Vacuolas de células vegetales 292
**8.17** Endocitosis 293
Endocitosis mediada por receptores y el papel de los hoyos recubiertos 294
El papel de los fosfoinosítidos en la regulación de las vesículas recubiertas 296
8.18 VÍAS EXPERIMENTALES 297
**Endocitosis mediada por receptor** 297
**8.19** La vía endocítica 300
**8.20** Fagocitosis 303
**8.21** Captación postraduccional de proteínas por peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos 304
Captación de proteínas en los peroxisomas 304
La absorción de proteínas en las mitocondrias 304
La absorción de proteínas en los cloroplastos 306

## 9 El citoesqueleto y la motilidad celular 309

**9.1** Resumen de las principales funciones del citoesqueleto 310
**9.2** Estructura y función de los microtúbulos 311
Estructura y composición de los microtúbulos 312
Proteínas asociadas a microtúbulos 313
Microtúbulos como soportes estructurales y organizadores 313
Microtúbulos como agentes de la motilidad intracelular 314
**9.3** Proteínas motoras: las cinesinas y las dineínas 315
Las proteínas motoras que atraviesan el citoesqueleto microtubular 315
Cinesinas 316
Dineína citoplásmica 317
9.4 VÍA EXPERIMENTAL 319
**El tamaño del paso de la cinesina** 319
**9.5** Centros organizadores de microtúbulos (MTOC) 321
Centrosomas 321
Cuerpos basales y otros MTOC 322
Nucleación de microtúbulos 322
**9.6** Dinámica de microtúbulos 323
Las propiedades dinámicas de los microtúbulos 323
Las bases subyacentes de la dinámica de los microtúbulos 325
**9.7** Estructura y función de los cilios y flagelos 327
Estructura de los cilios y los flagelos 329
Crecimiento por transporte intraflagelar 331
El mecanismo de la locomoción ciliar y flagelar 331
9.8 PERSPECTIVA HUMANA 333
**El papel de los cilios en el desarrollo y las enfermedades** 333
**9.9** Filamentos intermedios 335
Montaje y desmontaje de los filamentos intermedios 335
Tipos y funciones de filamentos intermedios 336
**9.10** Actina 338
Estructuras de la actina 338
Montaje y desmontaje de filamentos de actina 339
**9.11** La miosina: el motor molecular de la actina 341
Miosinas convencionales (tipo II) 341
Miosinas no convencionales 341
**9.12** Organización muscular y contracción 344
Organización de los sarcómeros 346
El modelo de filamento deslizante de la contracción muscular 346
**9.13** Las proteínas de unión a la actina 351
**9.14** Motilidad celular 353
9.15 VÍA EXPERIMENTAL 358
**Estudiando la motilidad basada en actina fuera de las células** 358

9.16 Procesos dependientes de actina durante el desarrollo 361
Crecimiento axonal 361
9.17 El citoesqueleto bacteriano 362

## 10 La naturaleza del gen y el genoma 366

10.1 Concepto de gen como una unidad de herencia 367
10.2 El descubrimiento de cromosomas 368
10.3 Cromosomas como portadores de información genética 369
10.4 Análisis genético en la *Drosophila* 370
Entrecruzamiento y recombinación 371
Mutagénesis y cromosomas gigantes 371
10.5 Estructura del DNA 373
La propuesta de Watson-Crick 374
Importancia de la propuesta de Watson-Crick 375
10.6 VÍAS EXPERIMENTALES 377
**Naturaleza química del gen** 377
10.7 DNA superenrollado 381
10.8 Complejidad del genoma 382
Desnaturalización del DNA 383
Renaturalización del DNA 384
10.9 PERSPECTIVA HUMANA 387
**Enfermedades que resultan de la expansión de las repeticiones de trinucleótidos** 387
10.10 Estabilidad del genoma: duplicación 389
Duplicación completa del genoma (poliploidización) 389
Duplicación y modificación de secuencias de DNA 390
Evolución de los genes de la globina 390
10.11 Naturaleza dinámica del genoma: "genes saltarines" 391
Transposones 392
Función de los elementos genéticos móviles en la evolución del genoma 393
10.12 Secuenciación de genomas: huellas de la evolución biológica 394
10.13 Genómica comparada: "si se conserva, debe ser importante" 396
10.14 Base genética del "ser humano" 397
10.15 Variación genética dentro de la población de la especie humana 398
Variación en la secuencia del DNA 398
Variación estructural 399
Variación del número de copias 399
10.16 PERSPECTIVA HUMANA 400
**Aplicación de análisis genómicos a la medicina** 400

## 11 El dogma central: del DNA al RNA a la proteína 404

11.1 Relación entre genes, proteínas y RNA 405
Evidencia de que el DNA es el material genético 405
Visión general del flujo de información a través de la célula 406
11.2 Papel de las RNA polimerasas en la transcripción 408
11.3 Descripción general de la transcripción en células procariotas y eucariotas 410
Transcripción en bacterias 410
Transcripción y procesamiento del RNA en células eucariotas 411
11.4 Síntesis y procesamiento de ribosomas eucariotas y RNA de transferencia 413
Síntesis y procesamiento del precursor rRNA 413
Papel de los snoRNA en el procesamiento del pre-rRNA 415
Síntesis y procesamiento del rRNA 5S 415
RNAs de transferencia 416
11.5 Síntesis y estructura de los RNA mensajeros eucarióticos 417
Formación de RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) 417
La maquinaria para la transcripción del mRNA 417
Estructura de los mRNA 419
11.6 Genes divididos: un hallazgo inesperado 420
11.7 Procesamiento de los RNA mensajeros eucarióticos 423
Tapas 5′ y colas de 3′ poli(A) 423
Empalme del RNA: eliminación de intrones de un RNA previo 425
11.8 Implicaciones evolutivas de los genes divididos y empalmes de RNA 429
11.9 Creación de nuevas ribozimas en el laboratorio 429
11.10 Interferencia por RNA 430
11.11 PERSPECTIVA HUMANA 432
**Aplicaciones clínicas de la interferencia por RNA** 432

11.12 RNA pequeños: miRNA y piRNA 433
Los miRNA: una clase de RNA pequeños que regulan la expresión génica 434
Los piRNA: una clase de RNA pequeños que funcionan en células germinales 435
11.13 CRISPR y otros RNA no codificantes 435
CRISPR: RNA no codificante en bacterias 435
Otros RNA no codificantes 436
11.14 Codificación de la información genética 436
Las propiedades del código genético 436
Identificación de codones 437
11.15 Decodificación de codones: el papel de los RNA de transferencia 439
Estructura del tRNA 439
Carga del tRNA 441
11.16 Traducción de información genética: inicio 442
Inicio de la traducción en las procariotas 442
Inicio de la traducción en las eucariotas 443
Papel del ribosoma 444
11.17 Traducción de información genética: elongación y terminación 445
Paso 1 de la elongación: selección del aminoacil-tRNA 445
Paso 2 de la elongación: formación de enlaces peptídicos 445
Paso 3 de la elongación: translocación 446
Paso 4 de la elongación: liberación del tRNA desacilado 447
Terminación 448
11.18 Vigilancia mRNA y control de calidad 448
11.19 Poliribosomas 449
11.20 VÍAS EXPERIMENTALES 450
**El papel del RNA como catalizador** 450

12 Control de la expresión genética **455**

12.1 Control de la expresión genética en las bacterias 456
Organización de genomas bacterianos 456
El operón bacteriano 456
Riboswitches 459
12.2 Estructura de la envoltura nuclear 460
El complejo de poros nucleares y su papel en el tráfico nucleocitoplasmático 462
Transporte de RNA 465
12.3 Empaquetado del genoma eucariota 465
Nucleosomas: el nivel más bajo de organización cromosómica 465
Niveles más altos de la estructura de la cromatina 467
12.4 Heterocromatina 469
Inactivación del cromosoma X 470
El código de histona y la formación de heterocromatina 470
12.5 Estructura de un cromosoma mitótico 473
Telómeros 473
Centrómeros 477
12.6 PERSPECTIVA HUMANA 478
**Aberraciones cromosómicas y trastornos humanos** 478
12.7 Epigenética: hay más para heredar que DNA 480
12.8 El núcleo como un organelo organizado 480
12.9 Descripción general de la regulación genética en eucariotas 483
12.10 Generación de perfiles de la actividad genética 485
Microarrays de DNA 485
Secuenciación de RNA 487
12.11 Papel de los factores de transcripción en la regulación de la expresión genética 488
12.12 Estructura de los factores de transcripción 489
El motivo dedo de zinc 490
El motivo hélice-asa-hélice (HLH, *helix-loop-helix*) 490
El motivo de cremallera de leucina 491
12.13 Sitios de DNA implicados en la regulación de la transcripción 492
12.14 Ejemplo de activación transcripcional: el receptor de glucocorticoides 494
12.15 Activación transcripcional: el papel de los potenciadores, promotores y coactivadores 495
Coactivadores que interactúan con la maquinaria de transcripción basal 496
Coactivadores que alteran la estructura de la cromatina 496
12.16 Activación transcripcional de polimerasas pausadas 499
12.17 Represión transcripcional 499
Metilación del DNA 500
Impronta genómica 501

RNA largos no codificantes (lncRNA) como represores transcripcionales 502

12.18 Control del procesamiento de RNA 503

12.19 Control transduccional 505

Iniciación de la traducción 505
Localización citoplasmática de mRNA 506
Control de la estabilidad del mRNA 506

12.20 Papel de los microRNA en el control traduccional 508

12.21 Control postraduccional: determinación de la estabilidad de la proteína 509

## 13 Replicación y reparación de DNA **512**

13.1 Replicación de DNA 513

13.2 Replicación de DNA en células bacterianas 516

Horquillas de replicación y replicación bidireccional 517
Desenrollado del dúplex y separación de las hebras 517
Las propiedades de las DNA polimerasas 518
Replicación semidiscontinua 519

13.3 La maquinaria que opera en la horquilla de replicación 521

13.4 Estructura y funciones de las DNA polimerasas 523

Actividades exonucleasas de las DNA polimerasas 523
Garantía de alta fidelidad durante la replicación de DNA 523

13.5 Replicación en los virus 526

13.6 Replicación del DNA en las células eucariotas 526

Iniciación de la replicación en células eucariotas 526
Restricción de la replicación una vez por cada ciclo celular 527
Horquilla de replicación eucariota 528
Replicación y estructura nuclear 530

13.7 Estructura y replicación de cromatina 530

13.8 Reparación del DNA 531

Reparación por escisión de nucleótidos 532
Reparación por escisión de base 532
Reparación del mal emparejamiento 534
Reparación de ruptura de la doble hebra 534

13.9 Entre la replicación y la reparación 535

13.10 PERSPECTIVA HUMANA 536
**Consecuencias de las deficiencias de reparación del DNA** 536

## 14 División celular **539**

14.1 El ciclo celular 540

Fases del ciclo celular 540
Ciclos celulares *in vivo* 541

14.2 Regulación del ciclo celular 542

14.3 VÍAS EXPERIMENTALES 543
**El descubrimiento y la caracterización del MPF** 543

14.4 Control del ciclo celular: el papel de las proteínas cinasas 546

Enlace de la ciclina 547
Fosforilación/desfosforilación de la Cdk 547
Inhibidores de la Cdk 548
Proteólisis controlada 548
Localización subcelular 548

14.5 Control del ciclo celular: puntos de control, inhibidores Cdk y respuestas celulares 550

14.6 Descripción general de la fase M: mitosis y citocinesis 552

14.7 Profase 552

Formación del cromosoma mitótico 552
Centrómeros y cinetocoros 555
Formación del huso mitótico 556
La disolución de la envoltura nuclear y la partición de los organelos citoplásmicos 558

14.8 Prometafase 559

14.9 Metafase 560

14.10 Anafase 562

El papel de la proteólisis en la progresión a través de la mitosis 562
Los eventos de la anafase 564
Fuerzas requeridas para los movimientos de los cromosomas en la anafase 564
El punto de control de ensamblaje del huso 566

14.11 Telofase y citocinesis 567

Proteínas motoras necesarias para los movimientos mitóticos 567
Citocinesis 567
Citocinesis en células vegetales: formación de la placa celular 570

14.12 Descripción general de la meiosis 571

14.13 Las etapas de la meiosis 574

14.14 PERSPECTIVA HUMANA 577
**La no disyunción meiótica y sus consecuencias** 577

14.15 Recombinación genética durante la meiosis 579

# 15 Señalización celular y transducción de señal: comunicación entre células **582**

15.1 Los elementos básicos de los sistemas de señalización celular 583

15.2 Un estudio de mensajeros extracelulares y sus receptores 586

15.3 Transducción de señal por receptores acoplados a proteína G 587

Receptores 587
Proteínas G 588
Terminación de la respuesta 589
Toxinas bacterianas 590

15.4 VÍAS EXPERIMENTALES 590

**El descubrimiento y la caracterización de las proteínas de unión a GTP** 590

15.5 PERSPECTIVA HUMANA 594

**Trastornos asociados con receptores acoplados a proteína G** 594

15.6 Segundos mensajeros 595

El descubrimiento de AMP cíclico 595
Segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol 596
Fosfolipasa C 597

15.7 La especificidad de las respuestas acopladas a proteínas G 599

15.8 Regulación de los niveles de glucosa en sangre 599

Movilización de la glucosa: un ejemplo de una respuesta inducida por cAMP 600
Amplificación de señal 600
Otros aspectos de las vías de transducción de señal del cAMP 600

15.9 La función de los GPCR en la percepción sensorial 603

15.10 Fosforilación proteína-tirosina como un mecanismo para la transducción de señal 603

Dimerización del receptor 604
Activación de la proteína cinasa 604
Interacciones proteína-proteína dependiente de fosfotirosina 604
Activación de las vías de señalización corriente abajo 604
Terminación de la respuesta 607

15.11 La vía de la cinasa Ras-MAP 607

Proteínas accesorias 608
Adaptación de MAP cinasa para transmitir diferentes tipos de información 610

15.12 Señalización por el receptor de insulina 611

El receptor de insulina es una proteína-tirosina cinasa 611
Sustratos del receptor de insulina 1 y 2 611
Transporte de glucosa 612
Diabetes mellitus 613

15.13 Vías de señalización en las plantas 613

15.14 La función del calcio como un mensajero intracelular 613

$IP_3$ y los canales de $Ca^{2+}$ activados por voltaje 613
Visualización de la concentración de $Ca^{2+}$ citoplasmático en las células vivas 614
Proteínas de unión al $Ca^{2+}$ 615
Regulación de las concentraciones de calcio en las células de las plantas 617

15.15 Convergencia, divergencia y comunicación cruzada entre diferentes vías de señalización 617

15.16 La función del NO como mensajero intercelular 619

El NO como un activador de guanilil ciclasa 620
Inhibición de la fosfodiesterasas 620

15.17 Apoptosis (muerte celular programada) 621

La vía extrínseca de la apoptosis 622
La vía intrínseca de la apoptosis 623
Necroptosis 624
Supervivencia de la señalización celular 624

# 16 Cáncer **627**

16.1 Propiedades básicas de una célula cancerosa 628

16.2 Causas del cáncer 631

16.3 VÍAS EXPERIMENTALES 632

**Descubrimiento de los oncogenes** 632

16.4 Cáncer: un desorden genético 636

16.5 Descripción de los genes supresores de tumores y oncogenes 638

16.6 Genes supresores de tumores: el gen *RB* 640

16.7 Genes supresores de tumores: el gen *TP53* 642

El papel de p53: guardián del genoma 642
El papel de p53 en la promoción de la senescencia 644

16.8 Otros genes supresores de tumores 645

16.9 Oncogenes 646

Oncogenes que codifican factores de crecimiento o sus receptores 646
Oncogenes que codifican las proteínas cinasas citoplásmicas 647
Oncogenes que codifican factores de transcripción 647
Oncogenes que codifican proteínas que afectan el estado epigenético de la cromatina 647
Oncogenes que codifican enzimas metabólicas 647
Oncogenes que codifican productos que afectan la apoptosis 648

16.10 Fenotipo mutador: genes mutantes involucrados en la reparación del DNA 649
16.11 MicroRNA: un nuevo participante en la genética del cáncer 649
16.12 El genoma del cáncer 649
16.13 Análisis de la expresión génica 651
16.14 Estrategias para combatir el cáncer 654
16.15 Inmunoterapia 654
16.16 Inhibición de la actividad de las proteínas promotoras del cáncer 656
16.17 Concepto de una célula madre del cáncer 658
16.18 Inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) 659

## 17 La respuesta inmune **661**

17.1 Caracterización general de la respuesta inmune 662
Respuestas innatas inmunes 663
Respuestas inmunes adaptativas 665
17.2 La teoría de la selección clonal como se aplica a las células B 666
17.3 PERSPECTIVA HUMANA 668
**Enfermedades autoinmunes** 668
17.4 Vacunación 671
17.5 VÍAS EXPERIMENTALES 672
**El papel del complejo mayor de histocompatibilidad en la presentación de antígenos** 672
17.6 Linfocitos T: activación y mecanismo de acción 675
17.7 La estructura modular de los anticuerpos 678
17.8 Reordenamientos de DNA que producen genes que codifican receptores de antígenos de células B y T 681
17.9 Complejos de receptores de antígeno unido a membrana 683
17.10 El complejo mayor de histocompatibilidad 684
17.11 Distinguiendo propio de no propio 686
17.12 Los linfocitos se activan por señales de superficie celular 689
Activación de células T colaboradoras por APC profesionales 689
Activación de las células B por las células $T_H$ 689
17.13 Vías de transducción de señales en la activación de linfocitos 689

## 18 Técnicas en biología molecular y celular **692**

18.1 El microscopio óptico 693
Resolución 694
Visibilidad 695
18.2 Microscopía de campo brillante y de contraste de fase 695
Microscopio óptico de campo brillante 695
Microscopio de contraste de fase 695
18.3 Microscopía de fluorescencia (y técnicas relacionadas basadas en la fluorescencia) 696
Microscopía confocal de escaneo láser 699
Microscopía de fluorescencia de súper resolución 699
Microscopía de fluorescencia mediante hoja de luz 700
18.4 Microscopía electrónica de transmisión 701
18.5 Preparación de las muestras para microscopía electrónica 703
Criofijación y el uso de muestras congeladas 703
Tinción negativa 705
Proyección de sombras 705
Replicación por congelación y fractura y grabado por congelación 705
18.6 Microscopía electrónica de barrido 707
18.7 Microscopía de fuerza atómica 708
18.8 El uso de radioisótopos 709
18.9 Cultivo celular 710
18.10 El fraccionamiento de los contenidos de una célula por centrifugación diferencial 711
18.11 Purificación y caracterización de proteínas mediante cromatografía líquida en columna 712

Cromatografía de intercambio iónico 712
Cromatografía de filtración en gel 712
Cromatografía de afinidad 713

**18.12 Determinación de proteínas: interacciones de las proteínas** 714

**18.13 Caracterización de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida** 715

SDS-PAGE 716
Electroforesis en gel bidimensional 716

**18.14 Caracterización de las proteínas por espectrometría** 716

**18.15 Caracterización de las proteínas mediante espectrometría de masas** 716

**18.16 Determinación de la estructura de las proteínas y los complejos multisubunitarios** 717

**18.17 Fraccionamiento de los ácidos nucleicos** 719

Separación de DNA mediante electroforesis en gel 719
Separación de ácidos nucleicos por ultracentrifugación 719

**18.18 Hibridación del ácido nucleico** 721

**18.19 Síntesis química del DNA** 722

**18.20 Tecnología del DNA recombinante** 723

Endonucleasas de restricción 723
Formación de los DNA recombinantes 723
Clonación del DNA 724

**18.21 Amplificación enzimática del DNA por PCR** 726

Proceso de PCR 727
Aplicaciones de PCR 728

**18.22 Secuenciación de DNA** 728

**18.23 Bibliotecas de DNA** 730

Bibliotecas genómicas 731
Bibliotecas de cDNA 731

**18.24 Transferencia de DNA en las células eucariotas *y* en los embriones de mamíferos** 732

Animales transgénicos 733
Plantas transgénicas 734

**18.25 Edición genética y silenciamiento** 734

Mutagénesis *in vitro* 735
Ratones knockout 735
Interferencia de RNA 736
Edición del genoma utilizando nucleasas de ingeniería 737

**18.26 El uso de los anticuerpos** 738

**Glosario** G-1

**Lecturas adicionales** L-1

**Términos clave** T-1

**Índice** I-1

# Premios Nobel concedidos por investigación en biología celular y molecular desde 1958

| *Año* | *Galardonado** | *Premio* | *Área de investigación* | *Páginas en el texto* |
|---|---|---|---|---|
| 2015 | Tomas Lindahl<br>Paul Modrich<br>Aziz Sancar | Química | Mecanismos de reparación del DNA | 532 |
| 2014 | Eric Betzig<br>W. E. Moerner<br>Stefan Hell | Química | Desarrollo de microscopía de fluorescencia súper-resolución | 699-700 |
| 2013 | James E. Rothman<br>Randy W. Schekman<br>Thomas C. Südhof | M & F** | Descubrimientos de mecanismos que regulan el tráfico en la vesícula | 263, 279 |
| 2012 | John B. Gurdon | M & F | Clonación animal, reprogramación nuclear, | 483 |
| | Shinya Yamanaka | | Reprogramación celular | 20, 489 |
| | Brian K. Kobilka<br>Robert J. Lefkowitz | Química | Receptores acoplados a proteína G | 588 |
| 2011 | Bruce A. Beutler<br>Jules A. Hoffmann | M & F | Inmunidad innata | 664 |
| | Ralph M. Steinman | | Células dendríticas e inmunidad adaptable | 676 |
| 2009 | Venkatraman Ramakrishnan<br>Thomas A. Steitz<br>Ada E. Yonath | Química | Estructura y función de los ribosomas | 453 |
| | Eliazbeth H. Blackburn<br>Carol W. Greider<br>Jack W. Szostak | M & F | Telómeros y telomerasa | 475 |
| 2008 | Francoise Barré-Sinoussi<br>Luc Montagnier | M & F | Descubrimiento del VIH | 23 |
| | Harald zur Hausen | | Papel del HPV en el cáncer | 631 |
| | Martin Chalfie<br>Osamu Shimomura<br>Roger Tsien | Química | Descubrimiento y desarrollo del GFP | 260, 697 |
| 2007 | Mario R. Capecchi<br>Martin J. Evans<br>Oliver Smithies | M & F | Desarrollo de técnicas para ratones con bloqueo genético | 735 |
| 2006 | Andrew Z. Fire<br>Craig C. Mello | M & F | Interferencia de RNA | 430 |
| | Roger D. Kornberg | Química | Transcripción en eucariotas | 412, 465 |
| 2004 | Richard Axel<br>Linda B. Buck | M & F | Receptores olfativos | 603 |
| | Aaron Ciechanover<br>Avram Hershko<br>Irwin Rose | Química | Ubicuitina y proteosomas | 509 |
| 2003 | Peter Agre<br>Roderick MacKinnon | Química | Estructura de los canales de la membrana | 143, 144 |
| 2002 | Sydney Brenner<br>John Sulston | M & F | Introducción de *C. elegans* como un organismo modelo | 16 |
| | H. Robert Horvitz | | Apoptosis en *C. elegans* | 622 |
| 2001 | John B. Fenn | Química | Ionización con electroespray en MS | 717 |
| | Koichi Tanaka | | MALDI en MS | 717 |
| | Kurt Wüthrich | | Análisis de proteínas con NMR | 55 |
| | Leland H. Hartwell<br>Tim Hunt<br>Paul Nurse | M & F | Control del ciclo celular | 547, 550 |

| *Año* | *Galardonado** | *Premio* | *Área de investigación* | *Páginas en el texto* |
|---|---|---|---|---|
| 2000 | Arvid Carlsson | M & F | Transmisión sináptica y transducción de señal | 164 |
| | Paul Greengard | | | 614 |
| | Eric Kandel | | | |
| 1999 | Günter Blobel | M & F | Tránsito de proteínas | 268 |
| 1998 | Robert Furchgott | M & F | El NO como mensajero intercelular | 620 |
| | Louis Ignarro | | | |
| | Ferid Murad | | | |
| 1997 | Jens C. Skou | Química | $Na^{+}/K^{+}$-ATPasa | 152 |
| | Paul Boyer | | Mecanismo de síntesis del ATP | 189, 190 |
| | John Walker | | | |
| | Stanley B. Prusiner | M & F | Estructura proteínica de los priones | 63 |
| 1996 | Rolf M. Zinkernagel | M & F | Reconocimiento por el sistema inmunológico de células infectadas por virus | 672 |
| | Peter C. Doherty | | | |
| 1995 | Edward B. Lewis | M & F | Control genético del desarrollo embrionario | 15 |
| | Christiane Nüsslein-Volhar | | | |
| | Eric Wieschaus | | | |
| 1994 | Alfred Gilman | M & F | Estructura y función de las proteínas (G) de unión del GTP | 593 |
| | Martin Rodbell | | | |
| | Kary Mullis | Química | Reacción en cadena de polimerasa (PCR) | 726 |
| 1993 | Michael Smith | | Mutagénesis dirigida a sitio (SDM) | 735 |
| | Richard J. Roberts | M & F | Secuencias intermedias | 420 |
| | Phillip A. Sharp | | | |
| 1992 | Edmond Fischer | M & F | Modificación de la actividad enzimática por fosforilación/defosforilación | 109, 600 |
| | Edwin Krebs | | | |
| 1991 | Erwin Neher | M & F | La medición del flujo iónico mediante registro placa-pinza | 143 |
| | Bert Sakmann | | | |
| 1990 | Joseph E. Murray | M & F | Trasplante de células y órganos en enfermedades humanas | 684 |
| | E. Donnall Thomas | | | |
| 1989 | J. Michael Bishop | M & F | Genes celulares capaces de causar transformaciones malignas | 633 |
| | Harold Varmus | | | |
| | Thomas R. Cech | Química | Habilidad del RNA para catalizar reacciones | 425, 450 |
| | Sidney Altman | | | |
| 1988 | Johann Deisenhofer | Química | Centro bacteriano de reacción de fotosíntesis | 207 |
| | Robert Huber | | | |
| | Hartmut Michel | | | |
| 1987 | Susumu Tonegawa | M & F | Reordenamientos del DNA que originan la diversidad de anticuerpos | 681 |
| 1986 | Rita Levi-Montalcini | M & F | Factores que afectan el crecimiento del nervio | 379 |
| | Stanley Cohen | | | |
| 1985 | Michael S. Brown | M & F | Regulación del metabolismo del colesterol y endocitosis | 319 |
| | Joseph L. Goldstein | | | |
| 1984 | Georges Köhler | M & F | Anticuerpos monoclonales | 738, 739 |
| | Cesar Milstein | | | |
| | Niels K. Jerne | | Formación de anticuerpos | 666 |
| 1983 | Barbara McClintock | M & F | Elementos móviles en el genoma | 391, 392, 394 |
| 1982 | Aaron Klug | Química | Estructura de complejos de ácido nucleico-proteína | 55 |
| 1980 | Paul Berg | Química | Tecnología DNA recombinante | 692, 723 |
| | Walter Gilbert | | Tecnología de secuenciación de DNA | 728 |
| | Frederick Sanger | | | |
| | Baruj Bennacerraf | M & F | Complejo mayor de histocompatibilidad | 684 |
| | Jean Dausset | | | 723 |
| | George D. Snell | M & F | Tecnología de restricción de endonucleasa | |
| 1978 | Werner Arber | | | |
| | Daniel Nathans | | | |
| | Hamilton O. Smith | | | |
| | Peter Mitchell | Química | Mecanismo quimioosmótico de fosforilación oxidativa | 176 |
| 1976 | D. Carleton Gajdusek | M & F | Enfermedades basadas en priones | 63 |
| 1975 | David Baltimore | M & F | Transcriptasa inversa y actividad viral tumoral | 633 |

| *Año* | *Galardonado** | *Premio* | *Área de investigación* | *Páginas en el texto* |
|---|---|---|---|---|
| | Renato Dulbecco | | | |
| | Howasrd M. Temin | | | |
| 1974 | Albert Claude | M & F | Estructura y función de componentes internos de las células | 262 |
| | Christian de Duve | | | |
| | George E. Palade | | | |
| 1972 | Gerald Edelman | M & F | Estructura de la inmunoglobulina | 678 |
| | Rodney R. Porter | | | |
| | Christian B. Anfinsen | Química | Relación entre estructura primaria y terciaria de proteínas | 60 |
| 1971 | Earl W. Sutherland | M & F | Mecanismo de acción hormonal y AMP cíclico | 590, 595, 596 |
| 1970 | Bernard Katz | M & F | Transmisión y propagación de impulsos nerviosos | 160 |
| | Ulf von Euler | | | |
| | Luis F. Leloir | Química | Papel de los nucleótidos del azúcar en la síntesis de hidratos de carbono | 273 |
| 1969 | Max Delbrück | M & F | Estructura genética de los virus | 23, 380 |
| | Alfred D. Hershey | | | |
| | Salvador E. Luria | | | |
| | H. Gobind Khorana | M & F | Código genético | 722-723 |
| 1968 | Marshall W. Nirenberg | | | |
| | Robert W. Holley | | Estructura del RNA de transferencia | 439 |
| | Peyton Rous | M & F | Virus tumorales | 632 |
| 1966 | Francois Jacob | M & F | Operones bacterianos y RNA mensajero | 406, 456 |
| 1965 | Andre M. Lwoff | | | |
| | Jacques L. Monod | | | |
| | Dorothy C. Hodgkin | Química | Estructura de moléculas biológicas complejas por rayos X | 717 |
| 1964 | John C. Eccles | M & F | Base iónica de potenciales de membrana de nervios | 160 |
| 1963 | Alan L. Hodgkin | | | |
| | Andrew F. | | | |
| | Huxley | | | |
| | Francis H. C. Crick | M & F | Estructura tridimensional del DNA | 374-377 |
| 1962 | James D. Watson | | | |
| | Maurice H. F. Wilkins | | | |
| | John C. Kendrew | Química | Estructura tridimensional de proteínas globulares | 56 |
| | Max F. Perutz | | | |
| | Melvin Calvin | Química | Bioquímica de la asimilación de $CO_2$ durante la fotosíntesis | 213, 214-215 666 |
| 1961 | F. MacFarlane Burnet | M & F | Teoría de selección clonal de formación de anticuerpos | |
| 1960 | Peter B. Medawar | | | |
| | Arthur Kornberg | M & F | Síntesis de RNA y DNA | 518, 523 |
| 1959 | Severo Ochoa | | | |
| | George W. Beadle | M & F | Expresión génica | 405-406 |
| 1958 | Joshua Lederberg | | | |
| | Edward L. Tatum | | | |
| | Frederick Sanger | Química | Estructura primaria de proteínas | 53 |

* En algunos casos se han omitido de esta lista colaboradores cuya investigación se realizó en un área fuera de la biología celular y molecular.
** Medicina y Fisiología.

# Temas de interés humano

*NOTA:* Una f después de una página denota una figura; t denota una tabla; fn denota una nota al pie; HP denota una perspectiva humana; EP denota una secuencia experimental.


**Accidente cerebrovascular,** 233, 241HP, capítulo 7
**Adenovirus,** 21HP, 23, 24f, 158HP, 420-421, 631, 641, 643, capítulo 1, capítulo 4, capítulo 11, capítulo 16
**Adicción a la nicotina,** 148EP, capítulo 4
**Adrenoleucodistrofia (ALD),** 197HP, capítulo 5
**Agammaglobulinemia,** 665, capítulo 17
**Agentes mutagénicos,** 371-372, capítulo 10
**ALD (adrenoleucodistrofia),** 197HP, capítulo 5
**ALL (leucemia linfoblástica aguda)** 644, 651, 653, capítulo 16
**Alzheimer, enfermedad de (AD),** 64-67HP, 66HPf, 165, capítulo 2, capítulo 4
**AML (leucemia mieloide aguda),** 647-648, 651, 652f, 653f, capítulo 16
**Análisis de genoma,** 390, capítulo 10
**Anemia de células falciformes,** 53, 53f, 437, capítulo 2, capítulo 11
**Anemias hemolíticas,** 137, capítulo 4
**Anestésicos,** 161, capítulo 4
**Aneuploidía,** 566, 577-578HP, 630, 630f, 643, 645, capítulo 14, capítulo 16
**Antiácidos, medicaciones,** 154, capítulo 4
**Antibióticos,** modos de 100-102HP, en uso clínico, 101HPt, capítulo 3
Penicilina, 99, 100HP, 101HPt, 102HP, capítulo 3
**Antidepresivos,** 165, capítulo 4
**Antígenos de grupo sanguíneo,** 122-123, 123f, 398, 684, capítulo 4, capítulo 10, capítulo 17
**Antioxidantes,** 35HP, capítulo 2
**Apetito,** 111, 165, capítulo 3, capítulo 4
**Ardor de estómago,** 20HP, 154, 402HP, capítulo 1, capítulo 4, capítulo 10
**Artritis reumatoide,** 669HP, 670HP, 671HP, 740, capítulo 11, capítulo 17, capítulo 18
**Ataque cardiaco/enfermedad cardiaca,** 18HP, 112HP, 231, 233, 241HP, 297EP, 302-303, 302f, 461, capítulo 1, capítulo 3, capítulo 7, capítulo 8, capítulo 12
**Aterosclerosis,** 302, capítulo 8
**Barrera hematoencefálica,** 247, capítulo 7
**Biofilms,** 13, 157HP, 583, capítulo 1, capítulo 4, capítulo 15
**Cáncer cervical,** 631, 632, 637, 637f, 660, capítulo 17
**Cáncer de colon**
Causa de, 631, 632, capítulo 16
Esfuerzos de investigación, 628, capítulo 16
Genes de supresión del tumor, 640t, capítulo 16
Mutaciones genéticas en, 642f, 645, 650, 650f, 658, capítulo 16
y NSAID, 632, capítulo 16
y receptor de EGF, 655, capítulo 16
**Cáncer de mama**
Análisis de expresión génica, 652-653, 654f, capítulo 16
Camino de PI3K en, 651, capítulo 16
cariotipo de célula de, 630f, capítulo 16
Causa de, 631, capítulo 16
Determinaciones de PSA para descubrimiento, 660, capítulo 16
Esfuerzos de investigación, 628, capítulo 16
Fosforilación de tirosina en células, 585f, capítulo 15
Genes de supresor del tumor en, 640t, capítulo 16
Inmunoterapia para, 655, capítulo 16
Mastectomía preventiva, 512, capítulo 13
Medicamentos que inhiben la proteína para, 657, capítulo 16
Mutaciones genéticas en, 640, 642f, 644, capítulo 16
Nuevos casos y muertes en Estados Unidos en 2015, 629f, capítulo 16
y *BRCA1*, 512, 645, capítulo 13, capítulo 16
y genética, 636, capítulo 16
**Cáncer de próstata**
Causa de, 632, capítulo 16
Esfuerzos de investigación, 628, capítulo 16
Inmunoterapia, 655, capítulo 16
Medicamentos que inhiben la proteína para, 657, capítulo 16
Mutaciones de *RB*, 640, capítulo 16
Mutaciones de TP53 en, 642f, 644, capítulo 16
Nuevas muertes y casos en Estados Unidos en 2015, 629f, capítulo 16
Prueba PSA, 72, capítulo 2
y genética, 636, capítulo 16
**Cáncer ovárico,** 642f, 645, 655, 658, capítulo 16
**Cáncer,** 627-660, capítulo 16
Activación de proto-oncogenes al, 638, 639, 639f, capítulo 16
Análisis de expresión génica, 651-654, 652f, 653f, 654f, capítulo 16
Aneuploidía, 630, 630f, capítulo 16
Angiogénesis, 659-660, capítulo 16
Causas de, 631-632, capítulo 16
Células de origen de tumores malignos, 636-637, 637f, capítulo 16
Células madre de cáncer, 658-659, capítulo 16
Células, propiedades de, 628-631, 629f, capítulo 16
Combatir, estrategias para, 654-660, capítulo 16
Como trastorno genético, 636-638, capítulo 16
Descripción del, 638-639, 638f, capítulo 16
Descubrimiento del, 633-636EP, capítulo 16
Efectos de privación de suero en crecimiento de, 629-630, 630f, capítulo 16
Esfuerzos de investigación, 628, capítulo 16
Fenotipo mutador, 649, capítulo 16
Gene *de PTEN*, 646, capítulo 16
Gene *de RB*, 640-641, 641f, capítulo 16
Gene de *TP53*, 642-645, 642f, capítulo 16
Genes de *APC*, 645, capítulo 16
Genes de *BRCA1/BRCA2*, 512, 645, capítulo 13, capítulo 16
Genes de supresor del tumor, 638-646, 638f, 640t, capítulo 16
Genoma de cáncer, 649-651, capítulo 16
Inhibición de actividad de proteínas que promueven el cáncer, 656-658, capítulo 16
Inmunoterapia, 654-656, capítulo 16
Metástasis, 628, 628f, capítulo 16
MicroRNA, 649, capítulo 16
Mieloma múltiple, 679, 680f, 681, 738-739, 739f, capítulo 17
Nuevas muertes y casos en Estados Unidos en 2015, 628, 629f, capítulo 16
Oncogenes, 646-648, capítulo 16
Quimioterapia, 628, 637, 644, 648, 653, 654, 655, 659, capítulo 16
Tasa de crecimiento, 629, 629f, capítulo 16
Terapia, PLK1 como objetivo para, 433HP, 433HPf, capítulo 11

Terapias seleccionadas, 654, capítulo 16
y dieta, 632, capítulo 16
**Cancerígenos,** 631, 632f, 643, capítulo 16
**Cariotipos,** 473, 630f, 640, 645, 651, capítulo 12, capítulo 16
**Células madre**
Adultas, 18HP, 18HPf, capítulo 1
Cáncer, 658-659, capítulo 16
Definidas, 18HP, capítulo 1
Embrionarias, 18-19HP, 19HPf, capítulo 1
Hematopoyéticas, 665, 666f, 671HP, capítulo 17
Mesenquimales, 18HP, capítulo 1
Pluripotentes inducidas, 19-21HP, 20HPf, capítulo 1
**Células madre embrionarias,** 18-19HP, 19HPf, 735-736, capítulo 1, capítulo 18
**Células madre pluripotentes inducidas (células IPS),** 19-21HP, 20HPf, 489, capítulo 1, capítulo 12
**Células nerviosas (neuronas)**
Estructura de, 159f, capítulo 4
Función de, 159, capítulo 4
Postsináptica, 148EPn, 164, 165, capítulo 4
Presináptica, 163, 163f, 164, 165, capítulo 4
Transmisión sináptica, 162-165, 163f, 164f, capítulo 4
**CLL (leucemia de linfocíticos crónica),** 655-656, capítulo 16
**Clonación de animales,** 483-484, 484f, capítulo 12
**CML (leucemia mielogénica crónica),** 75, 75f, 76, 649, 656, 659, capítulo 2, capítulo 16
**Coágulos de sangre,** 46, 49, 229, 231, 233, 233f, 281, 302, 392, 586, capítulo 2, capítulo 7, capítulo 8, capítulo 10, capítulo 15
**Colágeno, enfermedades de,** 226-228, 227f, 228f, capítulo 7
**Cólera,** 592-593EP, capítulo 15
**Colesterol**
**Colopatías,** 333-334HP, capítulo 9
como esteroide, importancia de, 47, capítulo 2
en fosfolípidos, 120, 120f, capítulo 4
en lípidos de la membrana, 120, 120f, capítulo 4
en membranas celulares, 47, 47f, capítulo 2
Estructura del, 39, 40f, 47f, capítulo 2
y azúcares simples, 42, capítulo 2
**Cromosoma marcador,** 477, capítulo 12
**Cromosomas**
Como transportistas de la información genética, 369-370, capítulo 10
Compactación, 544EP, 545EP, 552, 554, 574, capítulo 14
Definido, 368, capítulo 10
Descubrimiento de, 368-369, capítulo 10
Fertilización, proceso de, 368-369, 369f, capítulo 10
Gigante, 371-373, 372f, capítulo 10
Heterocromatina, 469-473, capítulo 12
Homólogo, 369, 370f, 371, 371f, capítulo 10
Mitótico, estructura de, 473-478, 474f, capítulo 12
Politene, 373, capítulo 10
Prematuro, 542, capítulo 14
Trastornos humanos y aberraciones de, 478-479HP, capítulo 12
X cromosoma inactivación, 470, capítulo 12
**Cromosomas sexuales,** 382, 469, 577-578HP, capítulo 10, capítulo 12, capítulo 14
**Daltonismo,** 470, 594HP, capítulo 12, capítulo 15
**Deficiencia de adherencia de leucocitos (LAD),** 242HP, capítulo 7
**Deficiencia de vitamina C,** 226, capítulo 7
**Degeneración macular,** 19-20HP, 401HP, 433HP, capítulo 1, capítulo 10, capítulo11
**Desarrollo de medicamentos,** 75, 111, 432HP, capítulo 2, capítulo 3, capítulo 11
**Desarrollo embrionario**
Caderinas en, 239-240, 240f, 362, capítulo 7, capítulo 9
Cambios durante la formación celular, 362, 363f
**Diabetes**
Diabetes insípida nefrogénica congénita, 142, capítulo 4
Hemoglobina A1c y, 42, capítulo 2
Tipo 1, 613, 669HP, capítulo 15, capítulo 17
Tipo 2, 613, capítulo 15
**Diabetes Tipo 1 (T1D),** 669HP, capítulo 17
**Diarrea,** 142, 593EP, capítulo 4, capítulo 15
**Dieta restringida a la caloría, y de vida útil,** 632, capítulo 16, 111-112HP, capítulo 3
**Dieta, cáncer, y** 632, capítulo 16
**Diferenciación de las células de la sangre,** 666f, capítulo 17
**Distrofia muscular,** 139, 338, 353, 449, 461, capítulo 4, capítulo 9, capítulo 11, capítulo 12
**Ejercicio,** 177-178HP, capítulo 5
**Embarazo, inmunidad basada en IgG,** 680-681, capítulo 17
**Enanismo,** 227, 536HP, capítulo 7, capítulo 13
**Encefalopatía espongiforme,** 63HP, capítulo 2
**Enfermedad de células-I,** 287-288HP, capítulo 8
**Enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD),** 62-64HP, capítulo 2
**Enfermedad de Fabry,** 287HPt, capítulo 8
**Enfermedad de Gaucher,** 287-288HP, 287HPt, capítulo 8
**Enfermedad de Graves y tiroiditis,** 669HP, capítulo 17
**Enfermedad de Huntington,** 433HP, capítulo 10
**Enfermedad de Krabbe,** 287HPt, capítulo 8
**Enfermedad de las vacas locas,** 63HP, capítulo 2
**Enfermedad de Niemann-Pick tipo C,** 287HPt, 288HP, 302, capítulo 8
**Enfermedad de Parkinson (PD),** 195-196HP, capítulo 5
**Enfermedad de Sandhoff,** 287HPt, capítulo 8
**Enfermedad de Tay-Sachs,** 287HPt, 288HP, capítulo 8
**Enfermedad periodontal,** 243HP, capítulo 7
**Enfermedades autoinmunes,** 668-671HP, capítulo 17
Artritis reumatoide, 669HP, capítulo 17
Enfermedades intestinales inflamatorias (IBDs), 669HP, capítulo 17
Esclerosis múltiple (MS), 669HP, capítulo 17
Lupus eritematoso sistémico (SLE), 669HP, 669HPf, capítulo 17
Tipo 1 diabetes (T1D), 669HP, capítulo 17
Tratamiento de, 670-671HP, capítulo 17
y enfermedad de graves, tiroiditis, 669HP, capítulo 17
**Enfermedades congénitas de glucosilación (CDG),** 274, capítulo 8
**Enfermedades de almacenaje de esfingolípidos,** 287HP, 287HPt, capítulo 8
**Enfermedades de intestino inflamado (IBD),** 669HP, capítulo 17
**Enfermedades mitocondriales,** 195-196HP, 196HPf, capítulo 5
**Enfermedades peroxisomales,** 196-197HP, capítulo 7
**Enfermedades renales poliquísticas (PKD),** 334HP, 334HPf, capítulo 9
**Enfermedades vesiculares,** 237, 245, 338, 671, capítulo 7, capítulo 9, capítulo 17
**Entrelazamientos neurofibrilares (NFT),** 64HPf, 67HP, capítulo 2
**Envejecimiento**
Prematuro (progeria), 461, 536HP, capítulo 12, capítulo 13
y radicales, 34-35HP, capítulo 2
y síndrome de Down (trisomía 21), 479HP, capítulo 14
y telómeros, 477, capítulo 12
y trastornos de mitocondria, 195HP, capítulo 5
**Errores innatos de metabolismo,** 405, capítulo 11
**Esclerosis múltiple (MS),** 162, 669HP, capítulo 4, capítulo 17
**Escorbuto,** 226, capítulo 1
**Estatinas,** 302, capítulo 8

**Examen de frotis,** 637, 637f, 660, capítulo 16
**Excitación sexual,** 620, capítulo 15
**Factor de necrosis tumoral (TNF),** 622, 623f, 676, capítulo 15
**Fibra muscular,** 346, 346f, capítulo 9
**Fibrosis quística (CF),** 139, 157-158HP, 157HPf, 275, 449, capítulo 4, capítulo 8, capítulo 11
**Fumar,** 148EPfn, 400HP, 631, capítulo 4, capítulo 10, capítulo 16
**Gas nervioso,** 98, 114, 115, 165, capítulo 3, capítulo 4
**Gleevec,** 75, 75f, 76, 99, 656-657, 657f, 659, capítulo 2, capítulo 3, capítulo 16
**Glucolípidos, enfermedades de,** 118f, 119-120, 119f, 120f, 122, 286-288HP, capítulo 4, capítulo 8
**Glucosa en la sangre,** 599-602, 599f, capítulo 15
**Grasas trans,** 47, capítulo 2
**Gripe,** 23, capítulo 1, 74, capítulo 2
**Gusto (gustación),** 603, capítulo 15
**Hemofilia,** 392, capítulo 10
**Herceptina,** 655, capítulo 16
**Hidrocefalia,** 239, 334HP, capítulo 7, capítulo 9
**Hipertensión,** 99, capítulo 3
- Azidotimidina (AZT) y, 526, capítulo 13
- Células $T_H$, 678, capítulo 17

**Huella del DNA,** 385, 385f, capítulo 10
**Inactivación del cromosoma X,** 470, capítulo 12
**Infecciones**
- Causa del cáncer, 623fn, capítulo 15
- Lítica, 24, 25f, capítulo 1
- Mecanismos protectores, 664, capítulo 17
- Resistente bacteriana, 102HP, capítulo 3
- Respuestas inmunes adaptables, 665, capítulo 17
- Respuestas inmunes innatas, 663-665, 665f, capítulo 17
- Viral, 24-25, 25f, capítulo 1

**Inflamación**
- Adherencia celular en, 241-243HP, 242HPf, capítulo 7
- Como respuestas innatas a invasión de patógenos, 664, capítulo 17

**Inmunidad humoral,** 665, capítulo 17
**Inmunidad mediada en la célula,** 665, 685, capítulo 17
**Inmunización,** 671, capítulo 17
**Inmunoterapia,** 654-656, capítulo 16
**Interferencia de RNA (RNAi),** 265, 265f, 430-432, 430f, 736-737, 737f, capítulo 8, capítulo 11, capítulo 18
**Interferón (IFN),** 676, capítulo 17
**Interleucinas (IL),** 676, capítulo 17
**Inyección de refuerzo,** 671, capítulo 17
**Leucemia**
- Análisis de expresión génica, 651-652, 653f, capítulo 16
- Células madre de cáncer, 659, capítulo 16
- Genoma de cáncer y, 649, capítulo 16
- Inmunoterapia para, 655, capítulo 16
- Linfoblástica aguda, 644, 651, 653, capítulo 16
- Linfocítica crónica, 655-656, capítulo 16
- Medicamentos que inhiben la proteína para, 656, capítulo 16
- Mielógena crónica, 656, capítulo 16
- Mielolide aguda, 647-648, 651, 652f, 653f, capítulo 16
- Mutaciones genéticas en, 644, capítulo 16
- Nuevas muertes y casos en Estados Unidos en 2015, 629f, capítulo 16
- y genes de supresión del tumor, 642, capítulo 16
- y genética, 636, capítulo 16
- y microRNA, 649, capítulo 16
- y oncogenes, 632-636EP, 647-648, capítulo 16

**Leucemia de linfocíticos crónica (CLL),** 655-656, capítulo 16
**Leucemia linfoblástica aguda (ALL),** 644, 651, 653, capítulo 16
**Leucemia mielogénica crónica (CML),** 75, 75f, 76, 649, 656, 659, capítulo 2, capítulo 16
**Leucemia mieloide aguda (AML),** 647-648, 651, 652f, 653f, capítulo 16
**Linfoma de Burkitt,** 631, 647, capítulo 16
**Linfoma no-Hodgkin de células B,** 655, capítulo 16
**Lipidosis por sulfátidos,** 287HPt, capítulo 8
***Listeria monocytogenes*,** 304, 358EP, capítulo 8, capítulo 9
**Longevidad,** 111-112HP, 477, 480, 507, 510, capítulo 3, capítulo 12
**Lupus eritematoso sistémico (SLE),** 669HP, 669HPf, capítulo 17
**Malaria,** 137, 631, 662, 685, capítulo 4, capítulo 16, capítulo 17
**Marihuana,** 165, 211, capítulo 4, capítulo 6
**Medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID),** 631, capítulo 16
**Medicamentos antiinflamatorios, cáncer de y,** 632, capítulo 16
**Médula ósea,** 18HP, 197HP, 231f, 235, 242HP, 288HP, 402HP, 475, 476, 481, 662, 662f, 665, 666f, 669HP, 686, capítulo 1, capítulo 5, capítulo 7, capítulo 8, capítulo 10, capítulo 12, capítulo 17
**Melanoma** genes de *BRAF* en, 647, 649, capítulo 16
- Genes de supresión del tumor, 640t, capítulo 16
- Inmunoterapia para, 655, capítulo 16
- Medicamentos que inhiben la proteína para, 657, 657f, 658, capítulo 16
- Mutaciones genéticas en, 642f, capítulo 16
- Nuevas muertes y casos en Estados Unidos en 2015, 629f, capítulo 16
- y radiación ultravioleta, 535, 536-537HP, 631, capítulo 13, capítulo 16

**Metabolismo,** 103-105, capítulo 3
- Definido, 103, capítulo 3
- Enzimas de, 6, 29EP, capítulo 1
- Errores innatos de, 405, capítulo 11
- Etapas de, 103, 104f, capítulo 3
- Fotosíntesis, 202-203, capítulo 6
- Reacciones de oxidación-reducción (redox), 103, capítulo 3
- Utilización y captura de energía, 103-105, capítulo 3

**Metástasis,** 628, 628f, 637, 645, capítulo 16
- Adherencia de células en, 241-243HP, 243HPf, capítulo 7
- Definida, 242HP, capítulo 7
- Dispersión de, pasos en, 243HPf, capítulo 7
- miRNA en, 649, capítulo 16
- Oncogenes en, 638, 639, capítulo 16
- Propiedades superficiales por la célula en, 242HP, capítulo 7
- Uniones de gap en, 251-253EP, capítulo 7

**Meticilina resistente *Staph aureus* (MRSA)**, 101, capítulo 3
**Microbioma,** 14-15, capítulo 1
**Músculo cardiaco,** 76, 178HP, 249, 620, capítulo 2, capítulo 5, capítulo 7, capítulo 15
**Mutaciones,** 370, capítulo 10
- Cambio de estructuras señaladas de proteínas, 594HP, capítulo 15
- Cociente espontáneo de, 524, capítulo 13
- en DNA, 27EP, capítulo 1
- Estructura molecular de genes y, 5, capítulo 1
- Función de ganancia, 388HP, capítulo 10
- Genéticas en cáncer de mama, 640, 642f, 644, capítulo 16
  - en cáncer de colon, 642f, 645, 650, 650f, 658, capítulo 16
  - en cáncer de próstata, 640, 642f, 644, capítulo 16
  - en células iPS, 20HP, capítulo 1
  - en leucemia, 644, capítulo 16
  - en melanoma, 642f, capítulo 16
  - en trastornos heredados, 62, 64HP, 66HP, 67HP, capítulo 2
- J. D., 299EP, capítulo 8
- Miosina, sordera y, 344, capítulo 9
- Sin sentido, 448, capítulo 11
- Somático, 594HP, capítulo 15
- Viral, 24, capítulo 1

**Número de genes,** 389, 390f, 394, capítulo 10
**Oler (olfato),** 603, capítulo 15
**Papiloma virus humano (HPV),** 631, capítulo 16

**Piel**
Cáncer (*véase* "Melanoma")
Enfermedades de ampollas, 237, 245, 338, 671, capítulo 7, capítulo 9, capítulo 17
Injertos, 684, capítulo 17
Uniones estrechas, 244f, 245-247, 246f, 247f, capítulo 7
**Poblaciones africanas, genomas de,** 385-386, capítulo 10
**Prilosec (omeprazol),** 154, capítulo 4
**Prions,** 64HP, 249, capítulo 2, capítulo 7
**Proyecto del genoma humano,** 402, 730, capítulo 10, capítulo 18
**Prozac,** 165, capítulo 4
**Pubertad precoz,** 594HPt, 595HP, capítulo 15
**Quimioterapia,** 628, 637, 644, 648, 653, 654, 655, 659, capítulo 16
**Radiación ultravioleta (UV), daño al DNA por,** 535, 536-537HP, capítulo 13
**Radiación, como cancerígena,** 372, 384, 534, 535, 536HP, 537HP, 550-551, capítulo 10, capítulo 13, capítulo 14
**Radicales libres, y envejecimiento,** 34-35HP, capítulo 2
**Rechazo de injerto,** 684, capítulo 17
**Rechazo de trasplante,** 684, 688, capítulo 17
**Reparación de DNA,** 531-535, capítulo 13
**Respuesta inmune (adquirida) adaptable,** 665, capítulo 17
**Respuesta inmune,** 661-691, capítulo 17
Activación de linfocitos por señales superficiales de la célula, 689, capítulo 17
Activación y mecanismo de acción de células T, 675-678, capítulo 17
Anticuerpos, estructura modular de, 678-681, capítulo 17
Cambios de lugar del DNA que producen genes que codifican receptores de antígeno de -células T y B, 681-683, capítulo 17
Complejos de receptor de antígeno ligados a la membrana, 683-684, capítulo 17
Descripción de, 662-665, capítulo 17
Distinguir lo propio de lo ajeno, 686-688, capítulo 17
Enfermedades autoinmunes, 668-671HP, capítulo 17
Histocompatibilidad principal compleja, 672-675HP, 684-686, capítulo 17
Inmunidad, 662, capítulo 17
La teoría de selección clónica aplicada a células B, 666-668, 666f, capítulo 17
Respuestas inmunes adaptables, 665, capítulo 17
Respuestas inmunes innatas, 663-665, 665f, capítulo 17
Sistema inmunológico, 662-663, 662f, capítulo 17
Vacunación, 671, capítulo 17
Vías de traslación de señales en la activación de linfocitos, 689-691, capítulo 17
**Respuestas inmunes innatas,** 663-665, 665f, capítulo 17
**Retinoblastoma,** 640-641, 641f, capítulo 16
**Retrovirus,** 393, 607, 631, 732, capítulo 10, capítulo 15, capítulo 16, capítulo 18
**Riñones**
Cáncer de, 640t, 642f, capítulo 16
Enfermedades renales poliquísticas, 334HP, 334HPf, capítulo 9
Fallo por diabetes, 224, capítulo 7
**Sarcoma de Kaposi,** 594HP, 631, capítulo 15, capítulo 16
**Señalización de insulina,** 611-613, capítulo 15

**Sida** (síndrome de inmunodeficiencia adquirida)
Resistencia, 595-596HP, 678, 684, 685, capítulo 15, capítulo 17
Resistencia a medicamentos, 74, 101-102HP, capítulo 2, capítulo 3
Terapias para, 433HP, capítulo 11
y células T auxiliares , 678, capítulo 17
**Síndrome de Cockayne (CS),** 536HP, capítulo 13
**Síndrome de Down (trisomía 21),** 479HP, capítulo 14
**Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (**Véase "AIDS")
**Síndrome de Klinefelter,** 578HP, capítulo 14
**Síndrome de Prader-Willi (PWS),** 501, capítulo 12
**Síndrome de Zellweger (ZS),** 196-197HP, capítulo 5
**Síndrome frágil X,** 389HPf, capítulo 10
**Sistema inmunológico,** 662-663, 662f, capítulo 17
**Sordera, miosina y mutaciones,** 344, capítulo 9
**Teoría de selección clonal aplicada a células B,** 666-668, 666f, 667f, 668f, capítulo 17
**Terapia de bacteriófago,** 25, capítulo 1
**Terapia de reemplazo de célula,** 17-21HP, capítulo 1
Células madre adultas, 18HP, 18HPf, capítulo 1
Células madre embrionarias, 18-19HP, 19HPf, capítulo 1
Células madre pluripotentes inducidas, 19-21HP, 20HPf, capítulo 1
Nueva programación de célula directa, 21HP, capítulo 1
**Terapia de reemplazo de enzima,** 287HP, capítulo 8
**Terapia génica,** 25, 158HP, 197HP, 732, capítulo 1, capítulo 4, capítulo 5, capítulo 18
**Testosterona,** 47, 47f, 632, capítulo 2, capítulo 15
**Timo,** 231f, 662, 662f, 665, 666f, 669HP, 671HP, 686, 688, 688f, capítulo 7, capítulo 17
**Tolerancia de lactosa,** 402HP, capítulo 10
**Tolerancia, inmunológica,** 668, 670HP, 678, capítulo 17
**Tos ferina,** 399, capítulo 19
**Toxinas bacterianas,** 590, capítulo 15
**Trasplante de médula ósea,** 18HP, 197HP, 242HP, capítulo 1, capítulo 5, capítulo 7
**Trastornos de almacenaje lisosomal,** 287HP, 287HPf, 287HPt, capítulo 8
**Trastornos del sistema nervioso,** 195-197HP, 338, 387-389HP, 669HP, 671HP, capítulo 5, capítulo 9, capítulo 10, capítulo 16
**Trastornos en el habla y el discurso,** 397, capítulo 10
**Tratamiento de,** 670-671HP, capítulo 17
**Tuberculosis,** 303, capítulo 3
**Tumores benignos,** 638, 644, 650, capítulo 16
**Vacunación,** 671, capítulo 17
**Vancomicina**, 102, capítulo 3
**Veneno de serpiente,** 233, capítulo 7
**Viagra,** 620, capítulo 15
**VIH** (virus de inmunodeficiencia humana), 23, 24f, 25, 25f, 102HP, 433HP, capítulo1, capítulo 3, capítulo 11
Azidotimidina (AZT) y, 526, capítulo 13
Células TH, 678, capítulo 17
**Virus del herpes (HHV-8),** 631, capítulo 16
**Virus,** 23-25, capítulo 1
Beneficios de los, 25, capítulo 1
Cápsides de, 23, 24f, capítulo 1
Especificidad de célula anfitrión de, cambios en, 24, capítulo 1
Infecciones virales, tipos de, 24-25, 25f, capítulo 1
Intervalo de anfitrión de, 24, capítulo 1
Propiedades de, 23, capítulo 1
Proteína en la superficie de, 23-24, 24f, capítulo 1
Réplica de DNA en, 526, capítulo 13
Resistencia a, interferón y, 676, capítulo 17
Respuesta inmune innata a, 663-665, 665f, capítulo 17
Tratamiento con RNAi, 432-433HP, capítulo 11
y oncogenes, 632-635EP, capítulo 16
**Visión,** 601, 603, capítulo 15
**Xeroderma pigmentoso (XP),** 535, 536HP, capítulo 13

CAPÍTULO 1

# Introducción al estudio de la célula y la biología molecular

## SOMOS CÉLULAS

Estamos hechos de células. Estas forman nuestra piel, nuestros órganos y nuestros músculos. El cerebro, el asiento de nuestros pensamientos y deseos, está hecho de células. Nuestros vasos sanguíneos se forman con células. La fertilización no es más que la unión de dos células para crear una sola célula nueva, que luego se multiplica para producir el embrión. Este crece hasta convertirse en adulto, al agregarse más y más células. Cuando nos enfermamos, a menudo es porque nuestras células se comportan de manera errática. Y cuando envejecemos, es porque nuestras células pierden gradualmente su fuerza. Después de que morimos y somos enterrados, los únicos restos de nuestra existencia son huesos, dientes y cabello, estructuras que fueron esculpidas en la vida por la actividad incesante de las células. Muchas medicinas funcionan cambiando la forma en que se comportan las células y, en los últimos años, las células mismas se usan como medicamentos para curar a las personas enfermas. Debido a que todos los seres vivos están hechos de una o más células, el origen de la vida corresponde al origen de las células. Para comenzar, en este capítulo exploraremos qué son las células y cómo funcionan, temas que se ampliarán a lo largo del libro.

LibrosMedicina.org

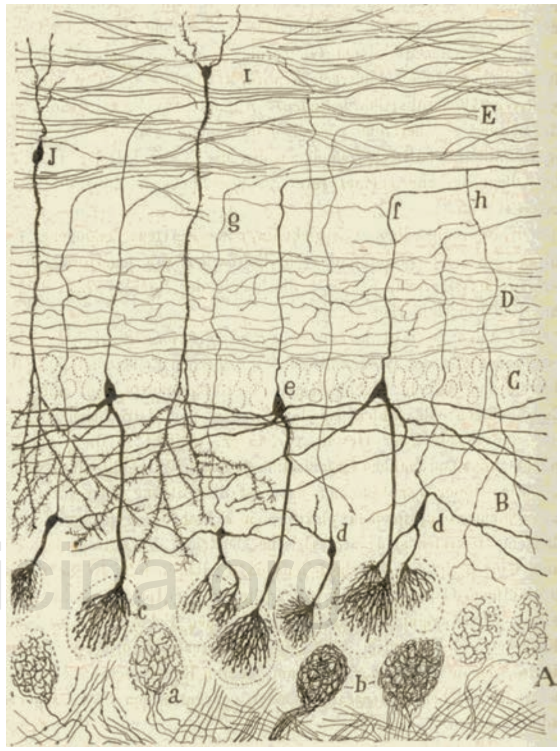



Diagrama de células nerviosas del cerebro del gato, dibujado por Santiago Ramón y Cajal. Ramón y Cajal fue el primero en reconocer que el cerebro está formado por un gran número de células individuales, en lugar de una red continua conectada, como lo propuso su rival Camillo Golgi. Ramón y Cajal, junto a Golgi libraron una batalla prolongada sobre este punto, pero finalmente el meticuloso detalle de la obra de Ramón y Cajal convenció al mundo de que el cerebro es, de hecho, un colectivo de células individuales.

FUENTE: *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates* por Cajal (1995). Figura: "Neurons in the cat brain". Con permiso de Oxford University Press.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**1.1** Descubrimiento de las células

**1.2** Propiedades básicas de las células

**1.3** Características que distinguen a las células procariotas y eucariotas

**1.4** Tipos de células procariotas

**1.5** Tipos de células eucariotas

**1.6** **PERSPECTIVA HUMANA:** Perspectiva de la terapia de reemplazo celular

**1.7** Tamaños de las células y sus componentes

**1.8** Virus y viroides

**1.9** **VÍAS EXPERIMENTALES:** Origen de las células eucariotas

## 1.1 Descubrimiento de las células



Las células y las estructuras que estas comprenden son demasiado pequeñas para ser vistas, escuchadas o tocadas de manera directa. A pesar de esta tremenda desventaja, las células son el tema de miles de publicaciones anuales, prácticamente todos los aspectos de su minúscula estructura se analizan de forma exhaustiva. En muchos sentidos, el estudio de la biología celular y molecular es un ejemplo de la pulsión del hombre por investigar y de su inteligencia creativa para idear instrumentos complejos y técnicas en pos de un descubrimiento. Esto no implica que los biólogos celulares y moleculares tengan el monopolio de estos nobles rasgos. En un extremo del espectro científico, los astrónomos utilizaron un telescopio en órbita para capturar imágenes de galaxias primordiales lejanas a la Tierra, gracias a lo cual se nos presentan hoy como existieron hace más de 13 mil millones de años, solo unos pocos cientos de millones de años después del Big Bang. En el otro extremo del espectro, los físicos nucleares lograron que los protones colisionaran entre sí a velocidades cercanas a la de la luz, confirmando la existencia de una partícula hipotética —el bosón de Higgs— que está propuesta para explicar el origen de la masa de las demás partículas subatómicas. Está claro que nuestro universo consiste en mundos dentro de otros mundos, y todos los aspectos que a ellos se refieren hacen fascinante su estudio.

Como se mostrará en las páginas de este libro, la biología celular y molecular es *reduccionista*, es decir, se basa en la opinión de que el conocimiento de las partes puede explicar el carácter del todo. Desde este punto de vista, nuestra percepción de la maravilla y el misterio de la vida puede ser reemplazada por la necesidad de explicar todo en términos del funcionamiento de la "maquinaria" del sistema viviente. En la medida en que esto ocurra, se espera que dicha pérdida pueda ser sustituida por una apreciación igualmente fuerte de la belleza y la complejidad de los mecanismos que subyacen a la actividad celular.

### Microscopía

Debido a su pequeño tamaño, las células solo se pueden observar con la ayuda de un **microscopio**, instrumento que proporciona una imagen ampliada de un objeto diminuto. No sabemos cuándo los humanos descubrieron la notable capacidad de las superficies de vidrio curvo para doblar la luz y formar imágenes. Las lentes ópticas se hicieron por primera vez en Europa, en el siglo XIII, y los primeros microscopios ópticos compuestos (de doble lente) se construyeron a fines del siglo XVI. A mediados del siglo XVII, un puñado de científicos pioneros había utilizado sus microscopios hechos a mano para descubrir un mundo que nunca se habría revelado a simple vista. El descubrimiento de las células (**FIGURA 1-1*a***) generalmente se atribuye a Robert Hooke, un microscopista inglés que, a los 27 años, recibió el puesto de conservador de la Royal Society of London, la principal academia científica de Inglaterra. Una de las muchas preguntas que Hooke intentó responder fue por qué los tapones hechos de corcho (parte de la corteza de los árboles) eran tan adecuados para mantener el aire en una botella. En 1665 escribió: "Tomé un buen pedazo de corcho limpio, y con un cuchillo tan afilado como una navaja de afeitar, corté un trozo, y... luego, examinándolo con un *Microscopio*, percibí que tenía una apariencia porosa... muy parecida a un panal de abejas". Hooke llamó a los poros *células*, porque le recordaban las celdas habitadas por los monjes que vivían en un monasterio. De hecho, Hooke había observado las paredes celulares vacías del tejido vegetal muerto, paredes que originalmente habían sido producidas por las células vivas que las rodeaban.

Mientras tanto, Antonie van Leeuwenhoek, un holandés que se ganaba la vida vendiendo ropa y botones, empleaba su tiempo libre moliendo lentes y construyendo microscopios simples de notable calidad (**FIGURA 1-1*b***). Durante 50 años, Leeuwenhoek envió cartas a la Royal Society of London, en las que describía sus observaciones microscópicas, junto con una descripción incoherente sobre sus hábitos diarios y el estado de su salud. Leeuwenhoek fue el primero en examinar una gota de agua estancada bajo el microscopio y, para su asombro, observó los "animálculos" microscópicos que iban y venían de un lado a otro ante sus ojos. También fue el primero en describir diversas formas de bacterias, las cuales obtuvo del agua en la que había remojado pimienta y del raspado de sus dientes. Sus cartas iniciales a la Royal Society, que describen este mundo nunca antes visto, fueron recibidas con tal escepticismo, que la sociedad envió a su curador, Robert Hooke, para confirmar las observaciones. Hooke hizo justamente eso, y Leeuwenhoek pronto fue una celebridad mundial, al punto de recibir en Holanda las visitas de Pedro el Grande de Rusia y de la reina de Inglaterra.



*a*)



*b*)

**FIGURA 1-1** El **descubrimiento de las células.** *a*) Uno de los microscopios compuestos (doble lente) más ornamentados de Robert Hooke. (Recuadro) Dibujo de Hooke de un corte delgado de corcho, que muestra la red de "células" en forma de panal. *b*) Microscopio de un solo lente utilizado por Antonie van Leeuwenhoek para observar bacterias y otros microorganismos. La lente biconvexa, que era capaz de aumentar un objeto aproximadamente 270 veces y proporcionar una resolución de alrededor de 1.35 µm, se sostenía entre dos placas de metal.

FUENTE: *a*) The Granger collection, New York; recuadro Biophoto Associates/Getty Images, Inc.; *b*) © Bettmann/Corbis

## Teoría celular

No fue sino hasta la década de 1830 que se extendió la importancia de las células. En 1838, Matthias Schleiden, un abogado alemán convertido en botánico, concluyó que, a pesar de las diferencias en la estructura de varios tejidos, las plantas estaban hechas de células, y que el embrión de la planta surgía de una sola célula. En 1839, Theodor Schwann, un zoólogo alemán y colega de Schleiden, publicó un informe exhaustivo sobre la base celular de la vida animal. Schwann concluyó que las células de las plantas y los animales son estructuras similares, y propuso estos dos principios de la **teoría celular**:

- Todos los organismos están compuestos por una o más células.
- La célula es la unidad estructural de la vida.

Las ideas de Schleiden y Schwann sobre el *origen* de las células demostraron ser menos esclarecedoras; ambos coincidieron en que las células podrían surgir de materiales no celulares. Dada la importancia que estos dos científicos tenían en el mundo de las ciencias, pasaron varios años antes de que las observaciones de otros biólogos fueran aceptadas como una demostración de que las células no surgían de esta manera, como tampoco los organismos surgían por generación espontánea. Hacia 1855, Rudolf Virchow, un patólogo alemán, había hecho un caso convincente para el tercer principio de la teoría celular:

- Las células pueden surgir únicamente por la división de una célula preexistente.

**REPASO**

1. Cuando Robert Hooke describió por primera vez las células, ¿qué estaba observando en realidad?
2. ¿Cuáles son los tres componentes de la teoría celular?

# 1.2 Propiedades básicas de las células

Así como las plantas y los animales están vivos, también lo están las células. La vida, de hecho, es la propiedad básica de las células, y las células son las unidades más pequeñas que exhiben esta propiedad. A diferencia de las partes de una célula, que simplemente se deterioran si están aisladas, las células completas se pueden sacar de una planta o animal y cultivarse en un laboratorio, donde crecerán y se reproducirán durante largos periodos. Si son maltratadas pueden morir. La muerte también se puede considerar una de las propiedades más básicas de la vida, porque solo una entidad viviente enfrenta esta circunstancia. Sorprenden-temente, dentro del cuerpo, las células en general mueren "por su propia mano", víctimas de un programa interno debido al cual las células que ya no se necesitan, o las células que presentan riesgo de convertirse en cancerosas, se eliminan a sí mismas.

En 1951, George y Martha Gey, de la Universidad Johns Hopkins, comenzaron el primer cultivo de células humanas. Las células se obtuvieron de un tumor maligno y se denominaron células HeLa, de acuerdo con el nombre de la donante, Henrietta Lacks. Las células HeLa, descendientes por división celular de esta primera muestra de células, todavía se cultivan en laboratorios de todo el mundo (**FIGURA 1-2**). Debido a que son mucho más simples de estudiar que las células situadas dentro del cuerpo, las células cultivadas ***in vitro*** (es decir, en cultivo, fuera del cuerpo) se han convertido en una herramienta esencial para los biólogos celulares y moleculares. De hecho, gran parte de la información que se discutirá en este libro se ha obtenido utilizando células que han crecido en cultivos de laboratorio.

Comenzaremos nuestra exploración de las células mediante el examen de algunas de sus propiedades fundamentales.

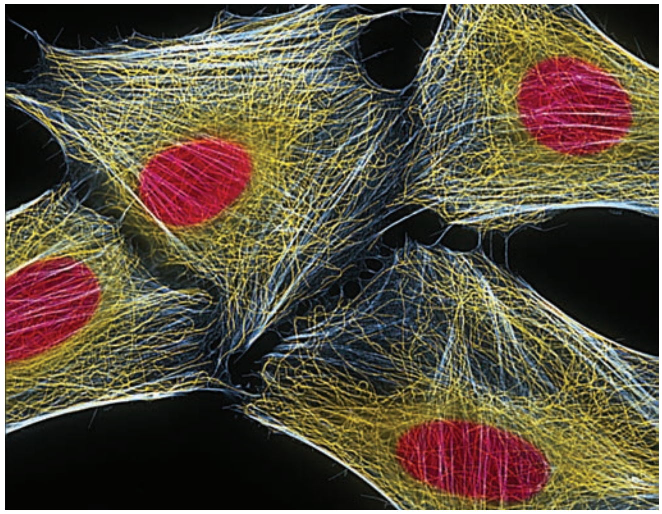


**FIGURA 1-2 Células Hela**, como las que se muestran aquí, fueron las primeras células humanas que se mantuvieron en cultivo durante largos periodos y todavía se usan en la actualidad. A diferencia de las células normales, que tienen una vida útil finita en cultivo, estas células HeLa cancerosas pueden cultivarse indefinidamente, siempre que las condiciones sean favorables para apoyar el crecimiento y la división celular.
FUENTE: Torsten Wittmann/Photo Researchers, Inc.

## Las células son altamente complejas y organizadas

La complejidad es una propiedad evidente cuando se encuentra, pero es difícil de describir. Por el momento, podemos pensar en la complejidad en términos de orden y consistencia. Cuanto más compleja sea una estructura, mayor será el número de partes que deben estar en su lugar apropiado, menor será la tolerancia a los errores en la naturaleza e interacciones de sus partes, y mayor regulación o control deberá ejercerse para mantener el sistema. Las actividades celulares pueden ser notablemente precisas. La duplicación del DNA, por ejemplo, ocurre con una tasa de error de menos de uno por cada diez millones de nucleótidos incorporados, y la mayoría de estos errores se corrigen con rapidez mediante un elaborado mecanismo de reparación que reconoce el defecto.

En el transcurso de este libro, tendremos ocasión de considerar la complejidad de la vida en varios niveles diferentes. Discutiremos la organización de los átomos en moléculas de tamaño pequeño; la organización de estas moléculas en polímeros gigantes, y la organización de diferentes tipos de moléculas poliméricas en complejos, que a su vez están organizados en organelos subcelulares y, finalmente, en células. Como quedará demostrado, hay una gran consistencia en todos los niveles. Cada tipo de célula tiene una apariencia consistente cuando se ve bajo un microscopio electrónico de alto poder, es decir, sus organelos tienen una forma y ubicación particular, de un individuo de una especie a otra. Del mismo modo, cada tipo de organelo tiene una composición consistente de macromoléculas, que están dispuestas en un patrón predecible. Considere las células que recubren su intestino, que son responsables de eliminar los nutrientes de su tracto digestivo. La **FIGURA 1-3** ilustra los muchos niveles diferentes de organización presentes en dicho tejido.

Las células epiteliales que recubren el intestino están estrechamente conectadas entre sí como ladrillos en una pared (figura 1-3, recuadro 1). Los extremos apicales de estas células, que se dirigen hacia la luz intestinal, tienen largas elongaciones (*microvellosidades*) que facilitan la absorción de nutrientes (recuadro 2). Las microvellosidades son capaces de proyectarse hacia afuera desde la superficie de la célula apical, porque contienen un esqueleto interno hecho de filamentos, que a su vez están compuestos de monómeros de proteína (*actina*) polimerizados en un conjunto característico (recuadro 3). En sus extremos basales, las células

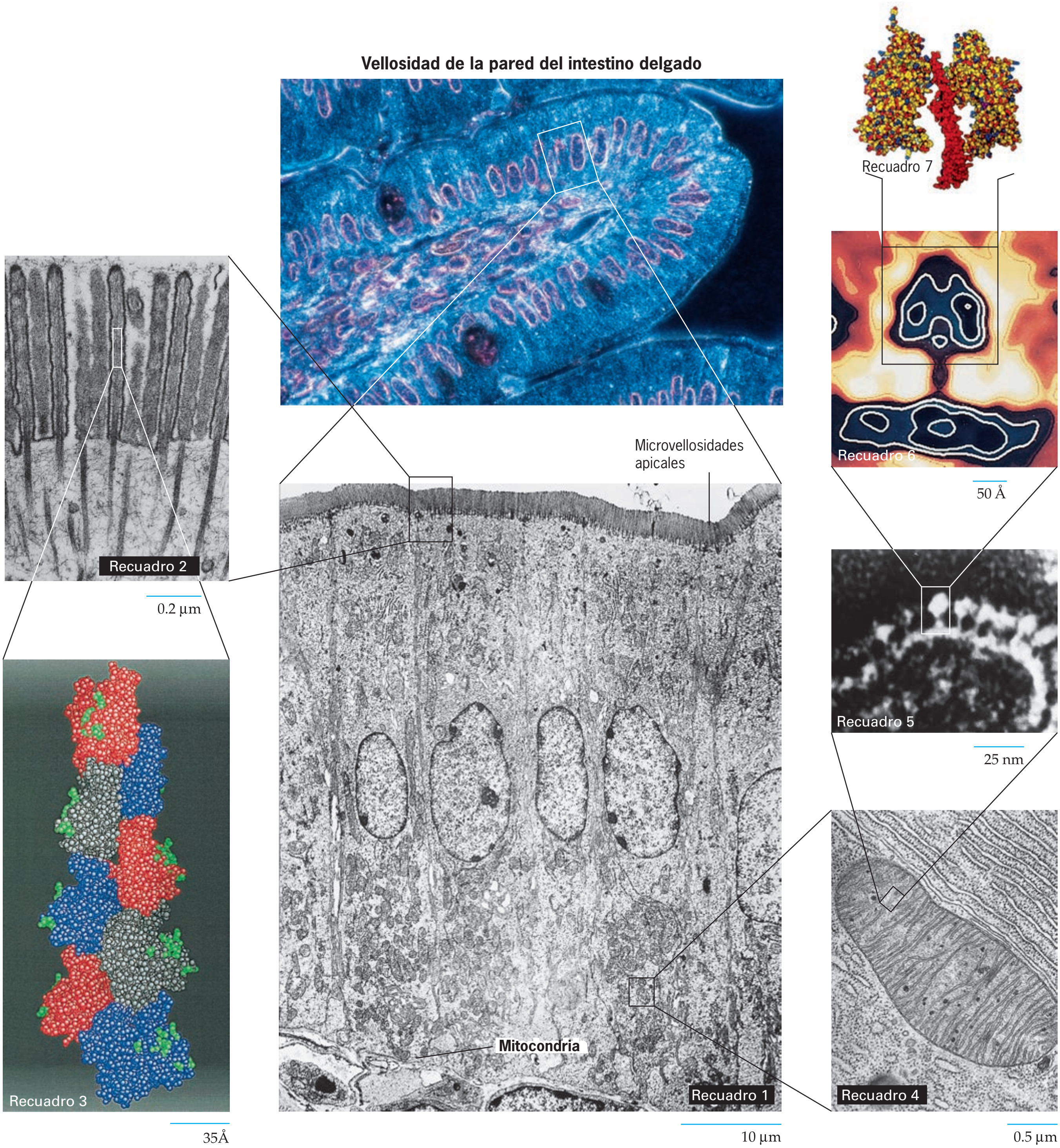



**FIGURA 1-3** Niveles de organización celular y molecular. La fotografía en colores brillantes de una sección teñida muestra la estructura microscópica de una vellosidad de la pared del intestino delgado, como se ve a través del microscopio óptico. El recuadro 1 expone una micrografía electrónica de la capa epitelial de las células que recubren la pared intestinal interna. La superficie apical de cada célula, que mira hacia el canal del intestino, contiene un gran número de microvellosidades involucradas en la absorción de nutrientes. La región basal de cada célula contiene grandes cantidades de mitocondrias, donde se produce energía disponible para la célula. El recuadro 2 muestra las microvellosidades apicales; cada microvellosidad contiene un haz de filamentos de actina. El recuadro 3 revela las subunidades de proteína de actina que componen cada filamento. El recuadro 4 muestra una mitocondria individual similar a las encontradas en la región basal de las células epiteliales. El recuadro 5 expone una porción de una membrana interna de una mitocondria, que incluye las partículas con tallo que se proyectan desde la membrana y que corresponden a los sitios donde se sintetiza ATP. Los recuadros 6 y 7 muestran modelos moleculares del mecanismo sintetizador de ATP, que se analiza detalladamente en el capítulo 5.

FUENTE: Light micrograph Cecil Fox/Photo Researchers; recuadro 1 cortesía de Shakti P. Kapur, Georgetown University Medical Center; recuadro 2 de Mark S. Mooseker y Lewis G. Tilney, *J Cell Biol* 1975;67:729, reproducido con permiso de Rockefeller University Press; recuadro 3 cortesía de Kenneth C. Holmes; recuadro 4 Keith R. Porter/Photo Researchers; recuadro 5 cortesía de Humberto Fernández-Moran; recuadro 6 cortesía de Roderick A. Capaldi; recuadro 7 cortesía de Wolfgang Junge, Holger Lill y Siegfried Engelbrecht, University of Osnabruck, Germany.

intestinales tienen grandes cantidades de mitocondrias (recuadro 4) que proporcionan la energía necesaria para alimentar los diversos procesos de transporte de membrana. Cada mitocondria está compuesta por un patrón definido de membranas internas, que a su vez están compuestas por un conjunto consistente de proteínas, incluido un mecanismo sintetizador de trifosfato de adenosina (ATP) eléctricamente activado que sobresale de la membrana interna como una pelota sobre un palo (recuadros 5-7).

Uno de los aspectos realmente fascinantes de las células es que logran organizarse en muchas escalas diferentes, utilizando procesos físicos que son, en esencia, aleatorios. A pesar de que las células vivas son altamente complejas y ordenadas, cada vez es más evidente en los últimos años que los eventos aleatorios (*estocásticos*) desempeñan un papel crítico en todas las actividades celulares. Muchas de las moléculas dentro de las células vivas están en un estado constante de movimiento aleatorio, impulsado por la energía térmica que adquieren de su entorno. Las células han desarrollado la capacidad de utilizar este movimiento de maneras altamente dirigidas. Teniendo en cuenta que se podrían describir muchos otros casos, podemos considerar un ejemplo de este fenómeno. Las proteínas son moléculas complejas que a menudo consisten en cientos de bloques de construcción de aminoácidos, y que alcanzan masas moleculares de más de 100 000 Dalton. A pesar de su gran tamaño, las proteínas consisten en una cadena polipeptídica que tiene que plegarse en una estructura tridimensional (nativa) definida con precisión. Si no se pliega correctamente, la proteína carecerá de una función significativa. En 1969, Cyrus Levinthal, de la Universidad de Columbia, identificó ciertas características de este proceso de plegado que se conoció como la paradoja de Levinthal. Para una parte de la paradoja, Levinthal señaló que, si el plegamiento de proteínas dependiera únicamente de movimientos moleculares aleatorios, se requeriría de un periodo mayor que la edad del universo, para que una proteína se pliegue en su estructura nativa. De acuerdo con este escenario, el tiempo que demoraría una proteína en plegarse adecuadamente podría compararse con el periodo necesario para que un mono sentado al piano componga uno de los conciertos de Beethoven. La paradoja inherente al plegamiento de proteínas se hace evidente cuando se sabe que, a pesar de su enorme complejidad, las proteínas en realidad adquieren sus estructuras nativas en fracciones de segundo. ¿Cómo se resuelve la paradoja? Aunque el plegamiento de una proteína es impulsado por un movimiento térmico aleatorio, el proceso ocurre de forma escalonada, de modo que la proteína se pliega a lo largo de vías en las que intermediarios menos estructurados guían la formación de intermediarios posteriores mejor formados. En otras palabras, la vía de plegamiento permite que las proteínas "salten" rápidamente de un paso al siguiente hasta alcanzar la estructura nativa. Para trasladar la solución de la paradoja del plegamiento de proteínas al mono en el piano, sería como si, cada vez que el mono tocara una tecla apropiada, esa nota se grabara, permitiendo al mono moverse hacia la siguiente nota del concierto. Siempre que el mono sea un jugador activo, la composición del concierto podría lograrse con bastante rapidez. Se puede decir que estos tipos de eventos son "parciales". Dependen de actividades aleatorias, pero conducen a resultados dirigidos, porque seleccionan etapas intermedias que se encuentran en el camino que lleva al resultado deseado.

Afortunadamente para los biólogos celulares y moleculares, la evolución ha avanzado con bastante lentitud en los niveles de organización biológica que a ellos les interesan. Mientras que un humano y un gato, por ejemplo, tienen características anatómicas muy diferentes, las células que conforman sus tejidos y los organelos que forman sus células son muy similares. El filamento de actina representado en la figura 1-3, recuadro 3, y la enzima sintetizadora de ATP del recuadro 6 son prácticamente idénticas a las estructuras semejantes encontradas en organismos tan diversos como los humanos, los caracoles, las levaduras y las secuoyas. La información obtenida al estudiar células de un tipo de organismo, con frecuencia tiene aplicación directa a otras formas de vida. Muchos de los procesos más básicos, como la síntesis de proteínas, la conservación de energía química o la construcción de una membrana son notablemente parecidos en todos los organismos vivos.

## Las células poseen un programa genético y los medios para usarlo

Los organismos se construyen de acuerdo con la información codificada en una colección de genes, los cuales están construidos de DNA. El programa genético humano contiene suficiente información, si se convierte en palabras, para llenar millones de páginas de texto. Sorprendentemente, esta gran cantidad de información está empaquetada en un conjunto de cromosomas que ocupa el espacio del núcleo de una célula, cientos de veces más pequeño que el punto en esta letra *i*.

Los genes son más que solo casilleros de almacenamiento para información: constituyen las recetas para construir estructuras celulares, las instrucciones para ejecutar actividades celulares y el programa para hacer más de sí mismos. La estructura molecular de los genes permite cambios en la información genética (mutaciones) que conducen a la variación entre los individuos, y esto forma la base de la evolución biológica. El descubrimiento de los mecanismos por los cuales las células usan y transmiten su información genética ha sido uno de los mayores logros de la ciencia en las últimas décadas.

## Las células son capaces de producir más de sí mismas

Así como los organismos individuales se generan por reproducción, así lo hacen también las células individuales. Las células se reproducen por división, un proceso en el que el contenido de una célula "madre" se distribuye en dos células "hijas". Antes de la división, el material genético se duplica fielmente, y cada célula hija recibe una parte completa e igual de información genética. En la mayoría de los casos, las dos células hijas tienen aproximadamente el mismo volumen. Sin embargo, en otros, como ocurre cuando un ovocito humano se divide, una de las células puede retener casi todo el citoplasma, aunque solo reciba la mitad del material genético (**FIGURA 1-4**).

## Las células adquieren y utilizan energía

Todo proceso biológico requiere del consumo de energía. Prácticamente toda la energía utilizada por la vida en la superficie de la Tierra llega en forma de radiación electromagnética del Sol. La energía de la luz queda atrapada por pigmentos absorbentes de luz presentes en las membranas de las células fotosintéticas




**FIGURA 1-4 Reproducción celular.** Este ovocito de mamífero ha sufrido recientemente una división celular muy desigual, en la que la mayoría del citoplasma se ha retenido dentro del ovocito grande, que tiene el potencial de ser fertilizado y convertirse en un embrión. La otra célula es un remanente no funcional que consiste, casi totalmente, en material nuclear (indicado por los cromosomas teñidos de azul, flecha).

FUENTE: Cortesía de Jonathan van Blerkom.

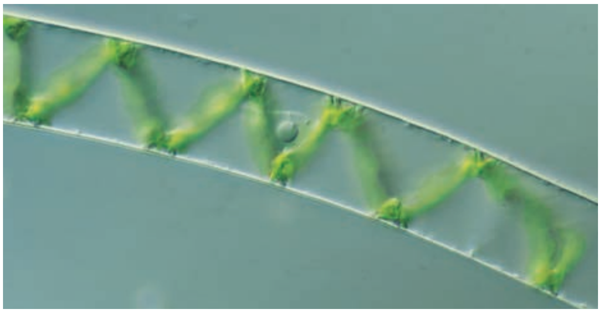


**FIGURA 1-5 Captación de energía.** Una célula viva del alga filamentosa *Spirogyra*. El cloroplasto en forma de cinta que se ve zigzagueando a través de la célula es el sitio donde se captura la energía de la luz solar y se convierte en energía química durante la fotosíntesis.

FUENTE: M. I. Walker/Photo Researchers, Inc.

(**FIGURA 1-5**). La energía de la luz se convierte por fotosíntesis en energía química que se almacena en carbohidratos ricos en energía, como sacarosa o almidón. Para la mayoría de las células animales, la energía llega preempacada, a menudo en forma de glucosa. En los humanos, la glucosa es liberada por el hígado hacia la sangre, donde circula a través del cuerpo entregando energía química a todas las células. Luego de llegar a una célula, la glucosa se desensambla de tal manera, que su contenido de energía se puede almacenar en una forma disponible (por lo general como ATP), que luego se utiliza para el funcionamiento de las innumerables actividades celulares que necesitan energía. Las células gastan una enorme cantidad de energía simplemente descomponiendo y reconstruyendo las macromoléculas y los organelos de los que están hechas. Este continuo "recambio", como se le denomina, mantiene la integridad de los componentes de la célula frente a los inevitables desgastes y rasgaduras, y permite que la célula responda con rapidez a las condiciones cambiantes.

## Las células llevan a cabo una variedad de reacciones químicas

Las células funcionan como plantas químicas miniaturizadas. Incluso la célula bacteriana más simple es capaz de cientos de transformaciones químicas diferentes, ninguna de las cuales ocurre a un ritmo significativo en el mundo inanimado. Prácticamente todos los cambios químicos que tienen lugar en las células requieren *enzimas*, moléculas que aumentan en gran medida la velocidad a la que se produce una reacción química. La suma total de las reacciones químicas en una célula representa el **metabolismo** de esa célula.

## Las células participan en actividades mecánicas

Las células son sitios de mucha actividad. Los materiales se transportan de un lugar a otro, las estructuras se ensamblan y luego se desmontan rápidamente y, en muchos casos, toda la célula se mueve de un sitio a otro. Este tipo de actividades se basa en cambios mecánicos y dinámicos dentro de las células, muchos de los cuales se inician por cambios en la forma de las proteínas "motoras". Las proteínas motoras son solo uno de los muchos tipos de "máquinas" moleculares empleadas por las células para llevar a cabo actividades mecánicas.

## Las células son capaces de responder a los estímulos

Algunas células responden a los estímulos de formas obvias; un protista unicelular, por ejemplo, se aleja de un objeto en su camino o se mueve hacia una fuente de nutrientes. Las células dentro de una planta o animal pluricelular responden a los estímulos de forma menos obvia. La mayoría de las células están cubiertas con *receptores* que interactúan con sustancias en el medio ambiente de maneras muy específicas. Las células poseen receptores de hormonas, factores de crecimiento y materiales extracelulares, así como también sustancias en las superficies de otras células. Los receptores de una célula proporcionan vías a través de las cuales los estímulos externos pueden provocar respuestas específicas en las células blanco. Las células pueden responder a estímulos específicos alterando sus actividades metabólicas, moviéndose de un lugar a otro, o incluso autodestruyéndose.

## Las células son capaces de autorregularse

En los últimos años se ha utilizado un nuevo término para describir las células: *robustez*. Las células son robustas, es decir, vigorosas o duraderas, porque están protegidas de fluctuaciones peligrosas en la composición y el comportamiento. Si ocurren tales fluctuaciones, se activan circuitos de retroalimentación específicos que sirven para devolver la célula al estado apropiado. Además de demandar energía, mantener un estado complejo y ordenado requiere una regulación constante. La importancia de los mecanismos regulatorios de una célula se vuelve más evidente cuando se descomponen. Por ejemplo, la falla de una célula para corregir un error cuando duplica su DNA puede resultar en una mutación debilitante, o una ruptura en las protecciones de control del crecimiento de una célula puede transformarla en una célula cancerosa con la capacidad de destruir todo el organismo. De modo gradual, estamos aprendiendo cómo una célula controla sus actividades, pero aún queda mucho más por descubrir.

Considere el siguiente experimento realizado en 1891 por Hans Driesch, un embriólogo alemán. Driesch descubrió que podía separar por completo las primeras dos o cuatro células de un embrión de erizo de mar, y que cada una de las células aisladas se desarrollaría en un embrión normal (**FIGURA 1-6**). ¿Cómo pue-

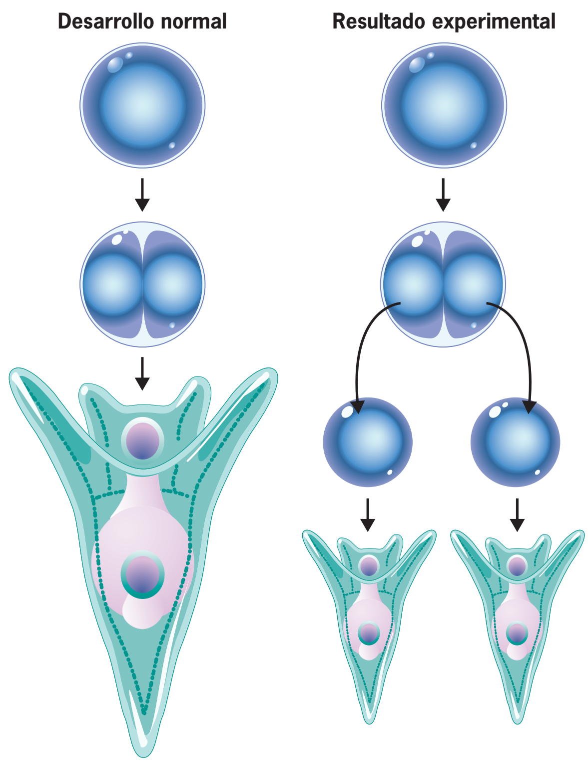



**FIGURA 1-6 Autorregulación.** El panel izquierdo representa el desarrollo normal de un erizo de mar, en el que un óvulo fertilizado da lugar a un único embrión. El panel de la derecha muestra un experimento en el que las células de un embrión temprano se separan unas de otras después de la primera división, y cada célula puede desarrollarse de forma aislada. En lugar de desarrollarse en la mitad de un embrión, como lo haría si no se interrumpe, cada célula aislada reconoce la ausencia de su vecino, regulando su desarrollo para formar un embrión completo (aunque más pequeño).

de una célula, que normalmente solo está destinada a formar parte de un embrión, regular sus propias actividades y formar un embrión completo? ¿Cómo reconoce la célula aislada la ausencia de sus vecinos, y cómo este reconocimiento redirige el curso completo del desarrollo de esta célula? ¿Cómo puede una parte de un embrión tener un sentido del todo? Actualmente no somos capaces de responder a estas preguntas mucho mejor que hace más de 100 años, cuando se realizó el experimento.

A lo largo de este libro, discutiremos los procesos que requieren una serie de pasos ordenados muy similar al ensamblaje en línea para la construcción de un automóvil, en el que los trabajadores agregan, eliminan o hacen ajustes específicos a medida que el automóvil avanza. En la célula, la información para el diseño del producto reside en los ácidos nucleicos, y los trabajadores de la construcción son principalmente las proteínas. Es la presencia de estos dos tipos de macromoléculas lo que, más que cualquier otro factor, diferencia la química celular de la química del mundo no vivo. En la célula, los trabajadores deben actuar sin el beneficio de una dirección consciente. Cada paso de un proceso debe ocurrir espontáneamente, de tal manera que el siguiente paso se active de modo automático. En muchos sentidos, las células funcionan de manera análoga al artilugio exprimidor de naranja descubierto por "El Profesor" y que se muestra en la **FIGURA 1-7**. Cada tipo de actividad celular requiere un conjunto único de herramientas y máquinas moleculares altamente complejas, que son producto de etapas de selección natural y evolución biológica. Un objetivo principal de los biólogos es comprender la estructura molecular y el papel de cada componente involucrado en una actividad particular, los medios por los cuales estos componentes interactúan y los mecanismos que regulan estas interacciones.

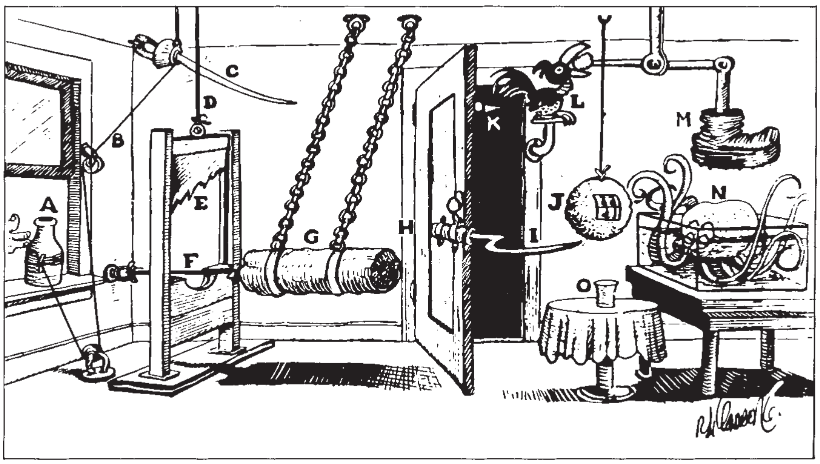
## Las células evolucionan

¿Cómo surgieron las células? De todas las preguntas principales planteadas por los biólogos, esta puede ser la que, probablemente, haya sido menos respondida. Se presume que las células evolucionaron a partir de algún tipo de forma de vida precelular, que a su vez evolucionó a partir de materiales orgánicos no vivos que estaban presentes en los mares primordiales. Mientras que el origen de las células está envuelto en un misterio casi total, su evolución puede estudiarse examinando organismos que están vivos en la actualidad. Si observara las características de una célula bacteriana que vive en el tracto intestinal humano (véase **FIGURA 1-18*a***) y una célula que es parte del revestimiento de ese tracto (figura 1-3), se sorprendería por las diferencias entre ambas. Sin embargo, estas dos células, así como todas las otras células que están presentes en los organismos vivos, comparten muchas características, incluyendo un código genético común, una membrana plasmática y ribosomas. Según uno de los principios de la biología moderna, todos los organismos vivos han evolucionado a partir de una única célula ancestral común que vivió hace más de tres mil millones de años. Debido a que dio origen a todos los organismos vivos que conocemos, a esta antigua célula a menudo se le conoce como el último ancestro común universal (o *LUCA*, *last universal common ancestor*). Examinaremos algunos de los eventos que ocurrieron durante la evolución de las células en "Vías experimentales", al final del capítulo. Los capítulos futuros explorarán los aspectos bioquímicos del origen de la vida. Tenga en cuenta que la evolución no es simplemente un evento del pasado, sino un proceso en desarrollo que continúa modificando las propiedades de las células que estarán presentes en los organismos que aún deben aparecer. Por ejemplo, la evolución de la resistencia a los medicamentos en las bacterias es una preocupación importante para la salud y se discutirá en la sección 3.8.

**REPASO**

1. Haga una lista de las propiedades fundamentales compartidas por todas las células. Describa la importancia de cada una de esas propiedades.
2. Describa las características de las células que sugieren que todos los organismos vivos se derivan de un ancestro común.
3. ¿Cuál es la fuente de energía que sustenta la vida en la Tierra? ¿Cómo pasa esta energía de un organismo al siguiente?

### Máquina exprimidora de jugo de naranja




El profesor Butts entra en el hueco abierto de un ascensor, y cuando aterriza en el fondo, encuentra una simple máquina de exprimir naranja. El lechero toma la botella de leche vacía (**A**), tira de la cuerda (**B**) que hace que la espada (**C**) corte el cable (**D**) y permita que la cuchilla de guillotina (**E**) caiga y corte la soga (**F**) que libera el ariete (**G**). El ariete choca contra la puerta abierta (**H**) y hace que se cierre. La hoz (**I**) corta una rodaja del extremo de la naranja (**J**), al mismo tiempo, el pincho (**K**) apuñala al "halcón con la ciruela" (**L**) que, al abrir la boca para gritar de dolor, libera la ciruela y permite a la bota del buzo (**M**) caer y pisar al pulpo dormido (**N**). El pulpo se despierta furioso y, al ver la cara del buzo que está pintada en la naranja, la ataca y la aplasta con sus tentáculos, lo que hace que todo el jugo de la naranja corra hacia el vaso (**O**).

Más adelante, puede usar el tronco para construir una cabaña, donde pueda criar a su hijo para ser presidente como Abraham Lincoln.

**FIGURA 1-7** Las **actividades celulares** con frecuencia son análogas a esta "máquina Rube Goldberg", en la cual un evento desencadena "automáticamente" el siguiente evento en una secuencia de reacción.

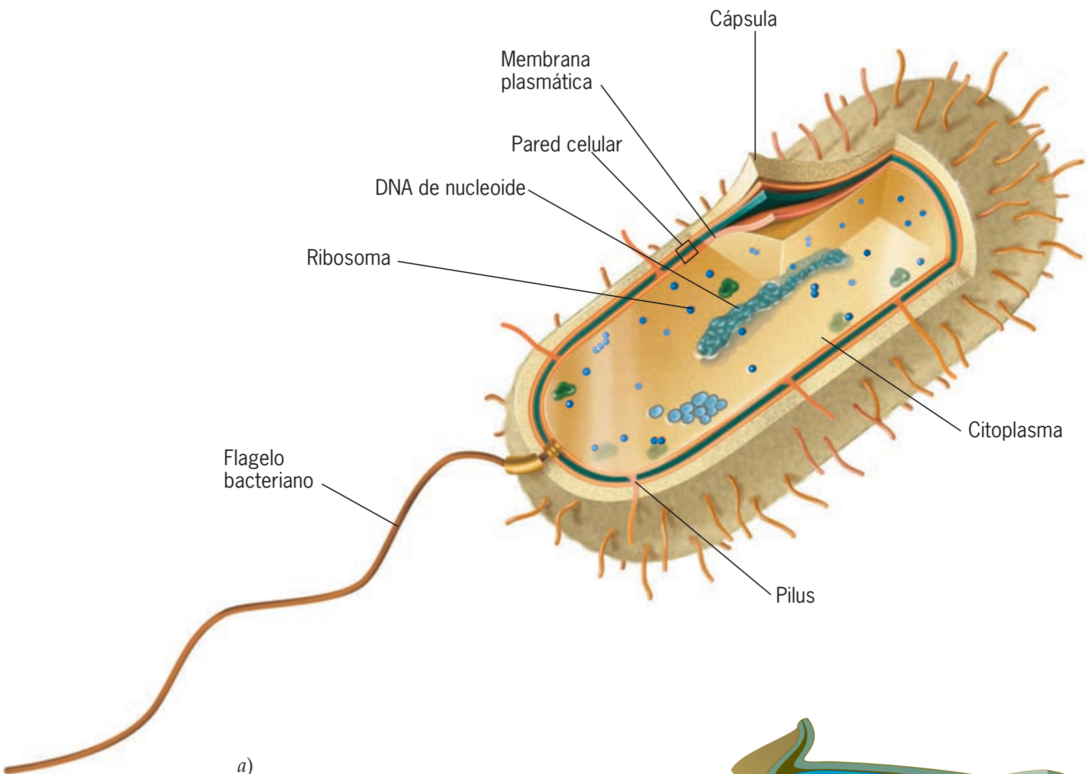
FUENTE: Rube Goldberg is the ® and © of Rube Goldberg, Inc.

## 1.3 Características que distinguen a las células procariotas y eucariotas

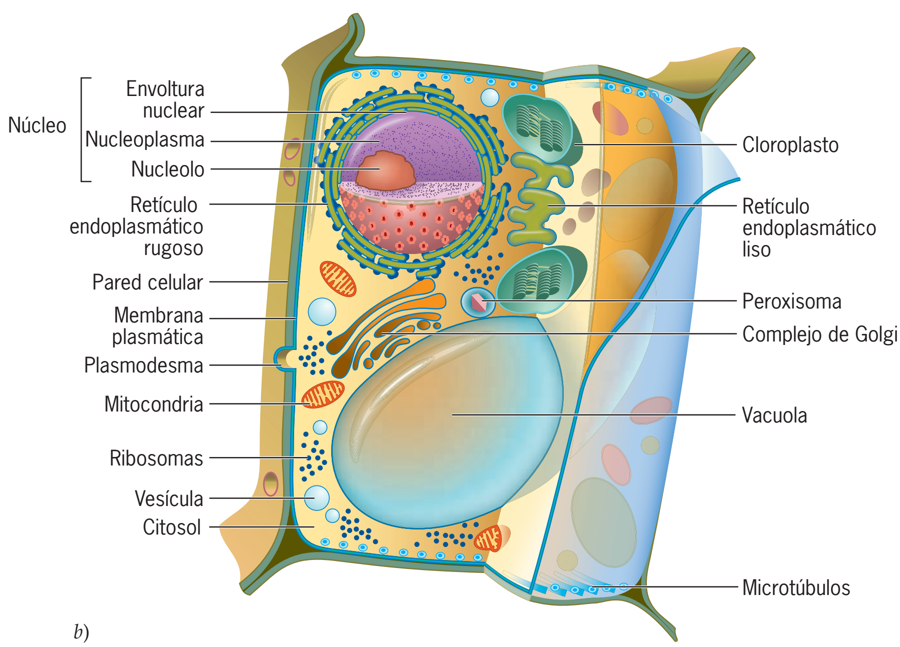
Una vez que el microscopio electrónico estuvo disponible de manera considerable, los biólogos pudieron examinar la estructura interna de una amplia variedad de células. Se puso de manifiesto, a partir de estos estudios, que había dos clases básicas de células —procariotas y eucariotas— que se distinguen por su tamaño y por los tipos de estructuras internas u **organelos** que contienen (**FIGURA 1-8**). La existencia de dos clases distintas de células, sin intermediarios conocidos, representa una de las divisiones evolutivas fundamentales en el mundo biológico. Las células **procariotas**, más simples estructuralmente, incluyen a las bacterias, mientras que las células **eucariotas**, estructuralmente más complejas, incluyen protistas, hongos, plantas y animales.[1]

No estamos seguros de cuándo las células procariotas aparecieron por primera vez en la Tierra. Se ha obtenido evidencia de vida procariota en rocas de aproximadamente 2 700 millones de años de edad. Estas rocas no solo contienen lo que parecen ser microbios fosilizados, sino que poseen moléculas orgánicas complejas que son características de tipos particulares de organismos procariotas, entre los que se incluyen las cianobacterias. Es poco probable que tales moléculas puedan haberse sintetizado de ma-

[1] Aquellos interesados en examinar una propuesta para profundizar el concepto de organismos procariotas *versus* eucariotas pueden leer un breve ensayo de N. R. Pace en *Nature* 441:289,2006.




*a*)




*b*)

**FIGURA 1-8 La estructura de las células**. Diagramas esquemáticos de una célula "generalizada" de bacterias *a*), plantas *b*) y animales *c*). *Nota:* Los organelos no están dibujados a escala.

FUENTE: Tomado de D. J. Des Marais. *Science* 289:1704, 2001. Copyright © 2000. Reimpreso con permiso de AAAS.

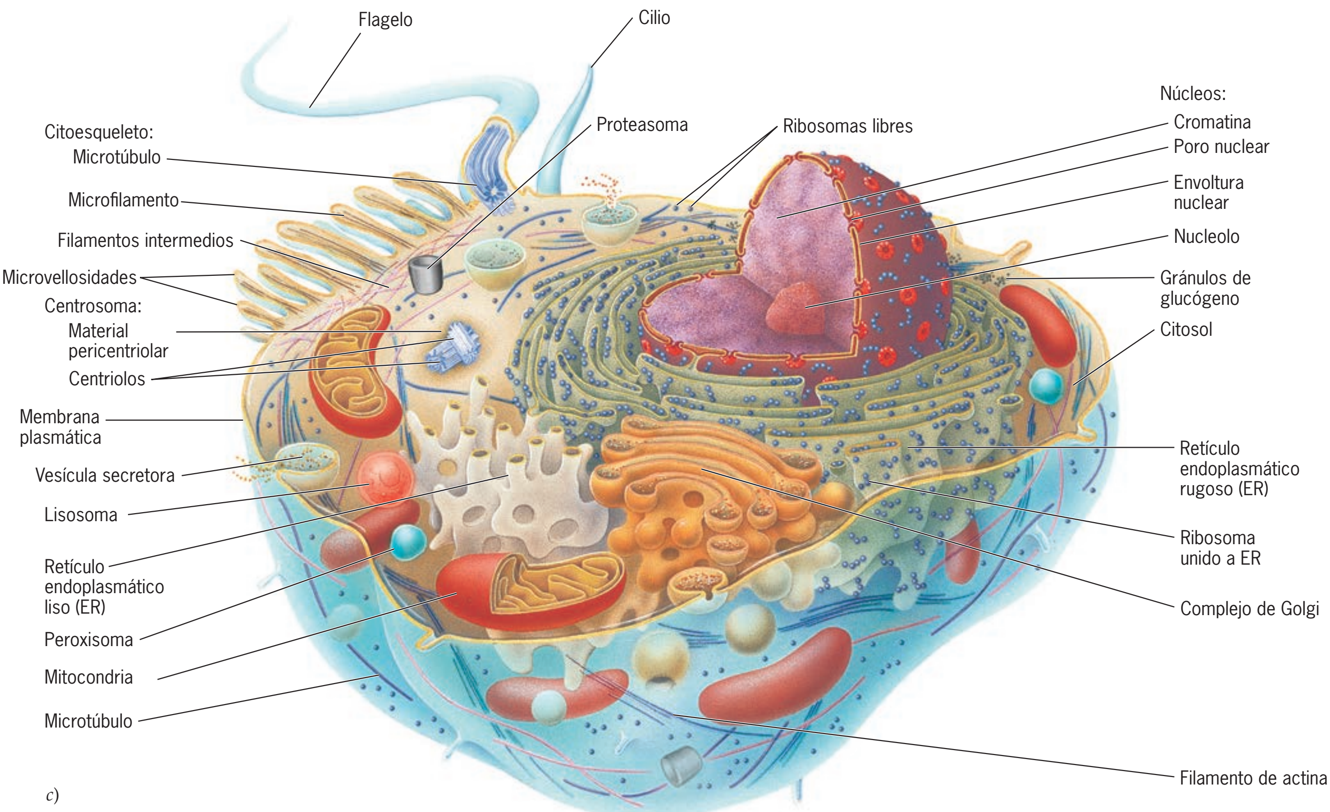



**FIGURA 1.8** (*continuación*)

nera abiótica, es decir, sin la participación de células vivas. Las cianobacterias, casi con certeza, aparecieron hace 2 400 millones de años, porque es cuando la atmósfera se infundió con oxígeno molecular ($O_2$), que es un subproducto de la actividad fotosintética de estas procariotas. El comienzo de la era de las células eucariotas también está envuelto en incertidumbre. Los animales pluricelulares complejos aparecen de forma bastante repentina en el registro fósil hace alrededor de 600 millones de años, pero hay evidencia considerable de que organismos eucariotas más simples estaban presentes en la Tierra más de 1 000 millones de años antes. El tiempo estimado de aparición en la Tierra de varios grupos principales de organismos se describe en la **FIGURA 1-9**. Incluso un examen superficial de dicha figura revela cómo la vida surgió "rápidamente" después de la formación de la Tierra y del enfriamiento de su superficie, y el tiempo que tardó la evolución posterior de animales y plantas complejos.

La siguiente breve comparación entre células procariotas y eucariotas revela muchas diferencias básicas entre ambos tipos, así como otras tantas similitudes (véase figura 1-8). Estas similitudes y diferencias se enumeran en la tabla 1-1. Las propiedades compartidas reflejan, casi con certeza, el hecho de que las células eucariotas evolucionaron a partir de antepasados procariotas. Debido a su ancestro común, los dos tipos de células poseen un lenguaje genético idéntico y un conjunto de vías metabólicas y muchas características estructurales semejantes. Por ejemplo, ambos tipos de células están delimitadas por membranas plasmáticas de construcción similar que sirven como una barrera selectivamente permeable entre los mundos vivos y no vivos. Ambos tipos de células pueden estar rodeadas por una *pared celular* rígida e inerte que protege la delicada forma de vida que se encuentra dentro. Aunque las paredes celulares de procariotas y eucariotas pueden tener funciones semejantes, sus composiciones químicas son muy diferentes.

Internamente, las células eucariotas son mucho más complejas, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, que las células procariotas (figura 1-8). La diferencia en la complejidad estructural es evidente en las micrografías electrónicas de una célula bacteriana y de una célula animal que se muestran en las figuras 1-18*a*) y 1-10, respectivamente. Ambas contienen una región nuclear que alberga el material genético de la célula, rodeada de citoplasma. El material genético de una célula procariota está presente en un **nucleoide**: una región mal demarcada de la célula, que carece de una membrana límite para separarla del

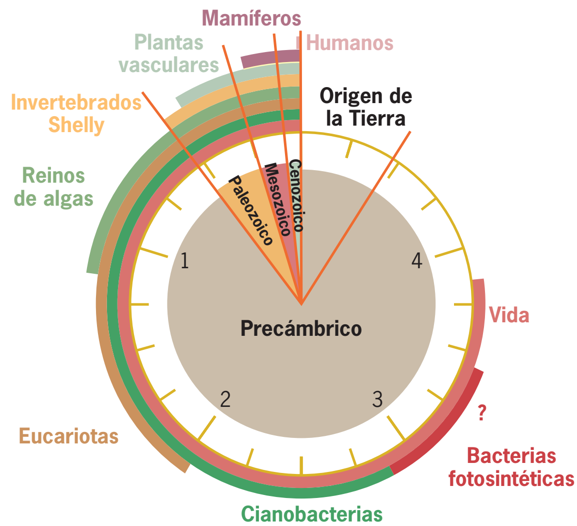



**FIGURA 1-9 Reloj biogeológico de la Tierra.** Retrato de los últimos 5 000 millones de años de la historia de la Tierra, que muestra un tiempo propuesto de aparición de los principales grupos de organismos. Los animales complejos (invertebrados shelly) y las plantas vasculares son relativamente recientes. El tiempo indicado para el origen de la vida es especulativo. Además, las bacterias fotosintéticas pueden haber surgido mucho antes, de ahí el signo de interrogación. Las eras geológicas están indicadas en el centro de la ilustración.

FUENTE: Tomada de D. J. Des Marais. *Science* 289:1704, 2001. Copyright © 2001. Reimpresa con permiso de AAAS.

**TABLA 1-1 Comparación entre células procariotas y eucariotas**

**Características que tienen en común los dos tipos de células:**

- Membrana plasmática de construcción similar.
- Información genética codificada en DNA utilizando un código genético idéntico.
- Mecanismos semejantes para la transcripción y traducción de información genética, incluyendo ribosomas similares.
- Vías metabólicas compartidas (p. ej., glucólisis y ciclo de TCA).
- Un aparato similar para la conservación de energía química como ATP (ubicado en la membrana plasmática de las procariotas y en la membrana mitocondrial de las eucariotas).
- Mecanismo similar de fotosíntesis (entre cianobacterias y plantas verdes).
- Mecanismo similar para sintetizar e insertar proteínas de membrana.
- Proteasomas (estructuras de digestión de proteínas) de construcción similar (entre arqueobacterias y eucariotas).
- Filamentos del citoesqueleto construidos con proteínas similares a la actina y la tubulina.

**Características de las células eucariotas que no se encuentran en las procariotas:**

- División de las células en núcleo y citoplasma, separados por una envoltura nuclear que contiene complejas estructuras de poros.
- Cromosomas complejos compuestos por DNA y proteínas asociadas que son capaces de compactarse en estructuras mitóticas.
- Organelos citoplasmáticos membranosos complejos (incluyen retículo endoplasmático, complejo de Golgi, lisosomas, endosomas, peroxisomas y glioxisomas).
- Organelos citoplasmáticos especializados para la respiración aeróbica (mitocondrias) y la fotosíntesis (cloroplastos).
- Sistema citoesquelético complejo (que incluye los filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos) y proteínas motoras asociadas.
- Flagelos complejos y cilios.
- Capacidad de ingerir material particulado por envoltura dentro de vesículas de la membrana plasmática (fagocitosis).
- Paredes celulares que contienen celulosa (en plantas).
- División celular usando un microtúbulo que contiene un huso mitótico que separa los cromosomas.
- Presencia de dos copias de genes por célula (diploidía), una de cada padre.
- Presencia de tres enzimas sintetizadoras de RNA diferentes (RNA polimerasas).
- Reproducción sexual que requiere meiosis y fecundación.

citoplasma circundante. Por el contrario, las células eucariotas poseen un **núcleo**: una región delimitada por una estructura membranosa compleja llamada *envoltura nuclear*. Esta diferencia en la estructura nuclear es la base de los términos *procariota* (*pro* = antes, *karyon* = núcleo) y *eucariota* (*eu* = verdadero, *karyon* = núcleo). Las células procariotas contienen cantidades relativamente pequeñas de DNA; el contenido de DNA de las bacterias varía desde alrededor de 600 000 pares de bases a casi 8 millones de pares de bases, y codifica entre unas 500 y varios miles de proteínas.[2] Aunque una célula de levadura de panadero "simple" tiene solo un poco más de DNA (12 millones de pares de bases que codifican cerca de 6 200 proteínas) que las procariotas más complejas, la mayoría de las células eucariotas contienen mucha más información genética. Tanto las células procariotas como las eucariotas tienen cromosomas que contienen DNA. Las células eucariotas poseen una cantidad de cromosomas separados, cada uno con una sola molécula lineal de DNA. En cambio, casi todas las procariotas que se han estudiado contienen un único cromosoma circular. Más importante aún, el DNA cromosómico de las eucariotas, a diferencia de las procariotas, está estrechamente asociado con las proteínas para formar un complejo material de nucleoproteínas conocido como **cromatina**.

El citoplasma de ambos tipos de células también es muy diferente. El citoplasma de una célula eucariota está lleno de una gran diversidad de estructuras, como se puede ver con facilidad si se examina una micrografía electrónica de casi cualquier planta o célula animal (**FIGURA 1-10**). Incluso la levadura, la eucariota más simple, es mucho más compleja estructuralmente que una bacteria promedio, a pesar de que estos dos organismos tienen un número similar de genes. Las células eucariotas contienen una matriz de organelos unidos a la membrana. Los organelos eucarióticos incluyen las mitocondrias, en las que se encuentra disponible la energía química para alimentar las actividades celulares; un retículo endoplasmático, en el que se fabrican muchas de las proteínas y lípidos de una célula; complejos de Golgi, donde los materiales se clasifican, modifican y transportan a destinos celulares específicos, y una variedad de vesículas simples de dimensión variable unidas a la membrana. Las células vegetales contienen organelos membranosos adicionales, incluidos los cloroplastos, que son los sitios de la fotosíntesis, y, a menudo, una sola vacuola grande que puede ocupar la mayor parte del volumen de la célula. Tomadas en conjunto, las membranas de la célula eucariota sirven para dividir el citoplasma en compartimentos dentro de los cuales pueden tener lugar actividades especializadas. Por el contrario, el citoplasma de las células procariotas está esencialmente desprovisto de estructuras membranosas. Se exceptúan de esta generalización, las membranas fotosintéticas complejas de las cianobacterias (véase figura 1-15).

Las membranas citoplasmáticas de las células eucariotas forman un sistema de canales y vesículas interconectados que funcionan en el transporte de sustancias desde una parte a otra de una célula, así como entre el interior de la célula y su entorno. Debido a su pequeño tamaño, la comunicación intracitoplasmática dirigida es menos importante en las células procariotas, en las que el movimiento necesario de los materiales se puede lograr por difusión simple.

Las células eucariotas también contienen numerosas estructuras que no poseen una membrana circundante. Se incluyen en este grupo los túbulos y filamentos alargados del citoesqueleto, que participan en la contractilidad, el movimiento y el soporte celular. Durante muchos años se pensó que las células procariotas carecían de cualquier rastro de un citoesqueleto, pero se han encontrado filamentos primitivos de citoesqueleto en las bacterias (véase capítulo 9). Todavía es justo decir que el citoesqueleto procariótico es mucho más simple en su estructura y función, que el de las eucariotas. Tanto las células eucariotas como las procariotas poseen ribosomas, partículas no membranosas que funcionan como "mesas de trabajo" en los que se fabrican las proteínas de la célula. Aunque los ribosomas de células procariotas y eucariotas tienen dimensiones considerablemente diferentes (los de las procariotas son más pequeños y contienen menos componentes), estas estructuras participan en el ensamblaje de proteínas mediante un mecanismo similar en ambos tipos de células. La **FIGURA 1-11** es una micrografía electrónica coloreada de una porción del citoplasma cerca del borde delgado de un organismo eucariota unicelular. Esta es una región de la célula donde los organelos unidos a la membrana tienden a estar ausentes. La micrografía muestra filamentos individuales del citoesqueleto (naranja) y otros grandes complejos macromoleculares del citoplasma (turquesa). La mayoría de estos complejos son ribosomas. Es evidente, a partir de este tipo de imagen, que el citoplasma de una célula eucariota está extremadamente lleno, dejando muy poco espacio para la fase soluble del citoplasma, la cual se denomina **citosol**.

Se pueden observar otras diferencias importantes entre células eucariotas y procariotas. Las células eucariotas se dividen por un complejo proceso de mitosis, en el que los cromosomas duplicados se condensan en estructuras compactas que se segregan

[2] Ocho millones de pares de bases equivalen a una molécula de DNA de casi 3 mm de largo.

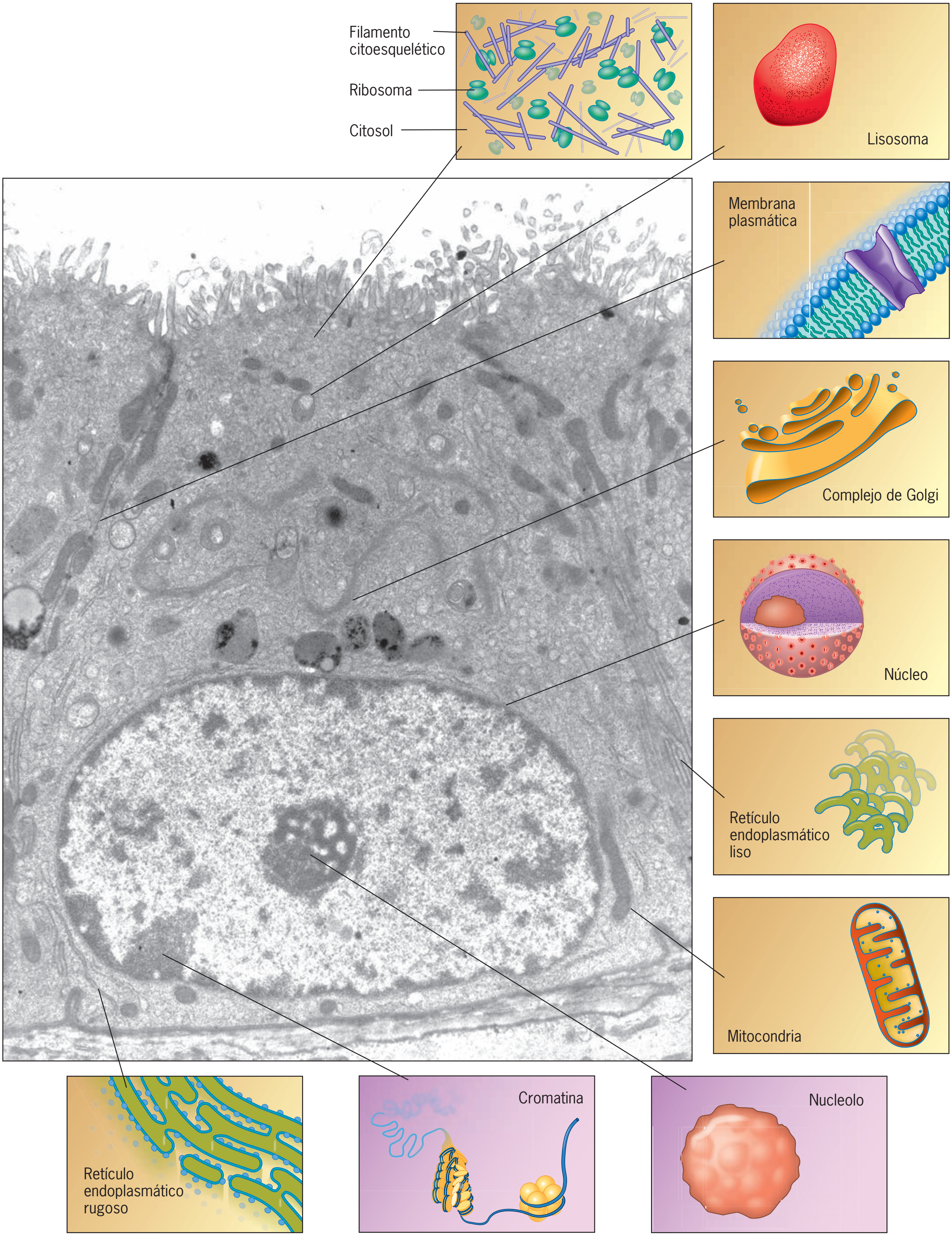



**FIGURA 1-10 Estructura de una célula eucariota.** Esta célula epitelial recubre el tracto reproductivo masculino en la rata. Varios organelos diferentes están indicados y representados en diagramas esquemáticos alrededor del borde de la figura.

FUENTE: David M. Phillips/Photo Researchers, Inc.

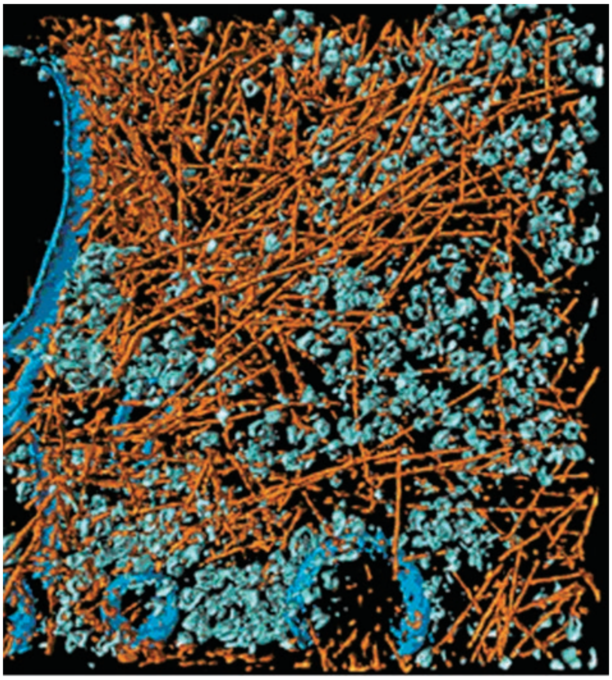


**FIGURA 1-11 El citoplasma de una célula eucariota es un compartimento lleno.** Esta imagen micrográfica electrónica coloreada muestra una pequeña región cerca del borde de un organismo eucariota unicelular que se había congelado rápidamente antes del examen microscópico. La apariencia tridimensional es posible mediante la captura de imágenes digitales bidimensionales de la muestra en diferentes ángulos, y la fusión de los cuadros individuales mediante una computadora. Los filamentos del citoesqueleto se muestran en naranja, los complejos macromoleculares (principalmente los ribosomas) son de color turquesa, y las porciones de las membranas celulares son azules.

FUENTE: Tomada de Ohad Medalia, *et al*. *Science* 2002;298:1211, figura 3*a*. © 2002, reimpresa con permiso de AAAS. Foto cortesía de Wolfgang Baumeister.

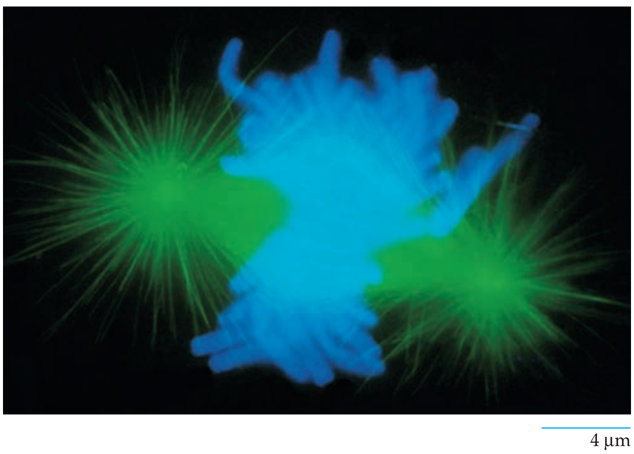



**FIGURA 1-12 La división celular en las eucariotas** requiere el ensamblaje de un elaborado aparato separador de cromosomas llamado huso mitótico, que está construido principalmente de microtúbulos. Los microtúbulos de esta micrografía aparecen en verde, porque están ligados por un anticuerpo que está unido a un colorante fluorescente verde. Los cromosomas, que estaban a punto de separarse en dos células hijas cuando se fijó esta célula, están teñidos de azul.

FUENTE: Cortesía de Conly L. Rieder.

mediante un complicado aparato que contiene microtúbulos (**FIGURA 1-12**). Este aparato, que se denomina *huso mitótico*, permite que cada célula hija reciba una matriz equivalente de material genético. En las procariotas, no existe huso mitótico para separar las copias del genoma después de la replicación. Alguna vez se pensó que las dos copias se separaban uniendo el DNA a la superficie de la célula, lo que permitía que el crecimiento de la membrana celular las separara. Sin embargo, las imágenes celulares vivas mostraron que el DNA se separaba más rápido de lo que crece la célula, por lo que el mecanismo preciso por el cual las procariotas segregan sus genomas sigue siendo una pregunta abierta. Algunos modelos actuales se basan en la compactación regulada o plegamiento del DNA, para que las dos copias se plieguen en dos masas separadas, apartándose así.

En su mayor parte, los procariotas son organismos asexuados. Contienen solo una copia de su cromosoma individual y no tienen procesos comparables a la meiosis, la formación de gametos o la fecundación real. Aunque no existen verdaderas reproducciones sexuales entre los procariotas, algunos son capaces de una *conjugación* en la que un trozo de DNA pasa de una célula a otra (**FIGURA 1-13**). Sin embargo, el receptor casi nunca recibe un cromosoma completo del donante, y la condición en la que la célula receptora contiene su propio DNA y el de su compañera es fugaz. La célula pronto vuelve a la posesión de un solo cromosoma. Aunque los procariotas pueden no ser tan eficientes como los eucariotas en el intercambio de DNA con otros miembros de su propia especie, son más hábiles que los eucariotas para recoger e incorporar DNA extraño de su entorno, lo que ha tenido un impacto considerable en la evolución microbiana (página 29).

Las células eucariotas poseen una variedad de mecanismos locomotores complejos, mientras que los de las procariotas son relativamente simples. El movimiento de una célula procariota puede lograrse mediante un delgado filamento proteico, llamado *flagelo*, que sobresale de la célula y gira (**FIGURA 1-14*a***). Las rotaciones del flagelo, que pueden exceder 1 000 veces por segundo,

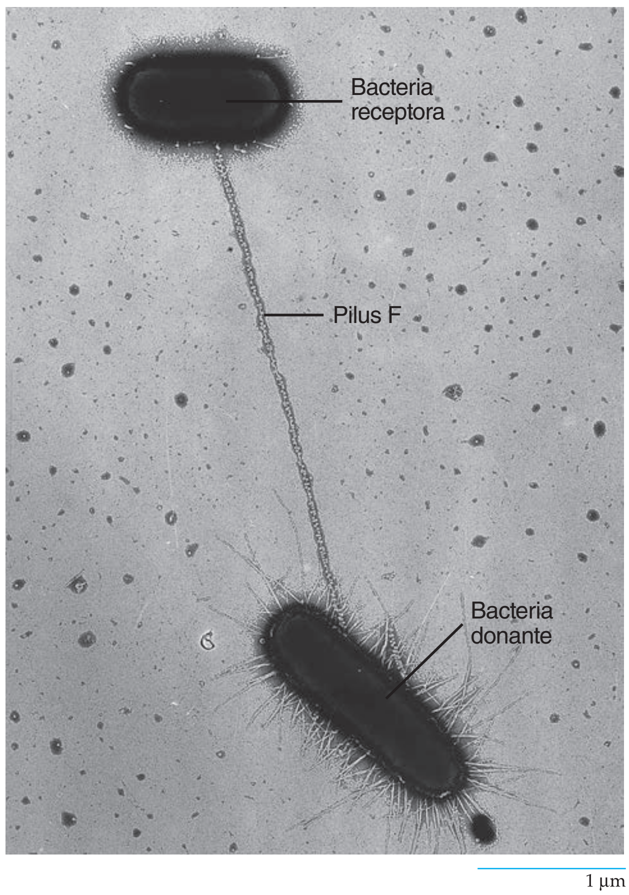



**FIGURA 1-13 Conjugación bacteriana.** Micrografía electrónica que muestra un par de bacterias en conjugación unidas por una estructura de la célula donante, denominada pili F, a través de la cual se cree que pasa el DNA.

FUENTE: Cortesía de Charles C. Brinton, Jr. y Judith Carnahan.

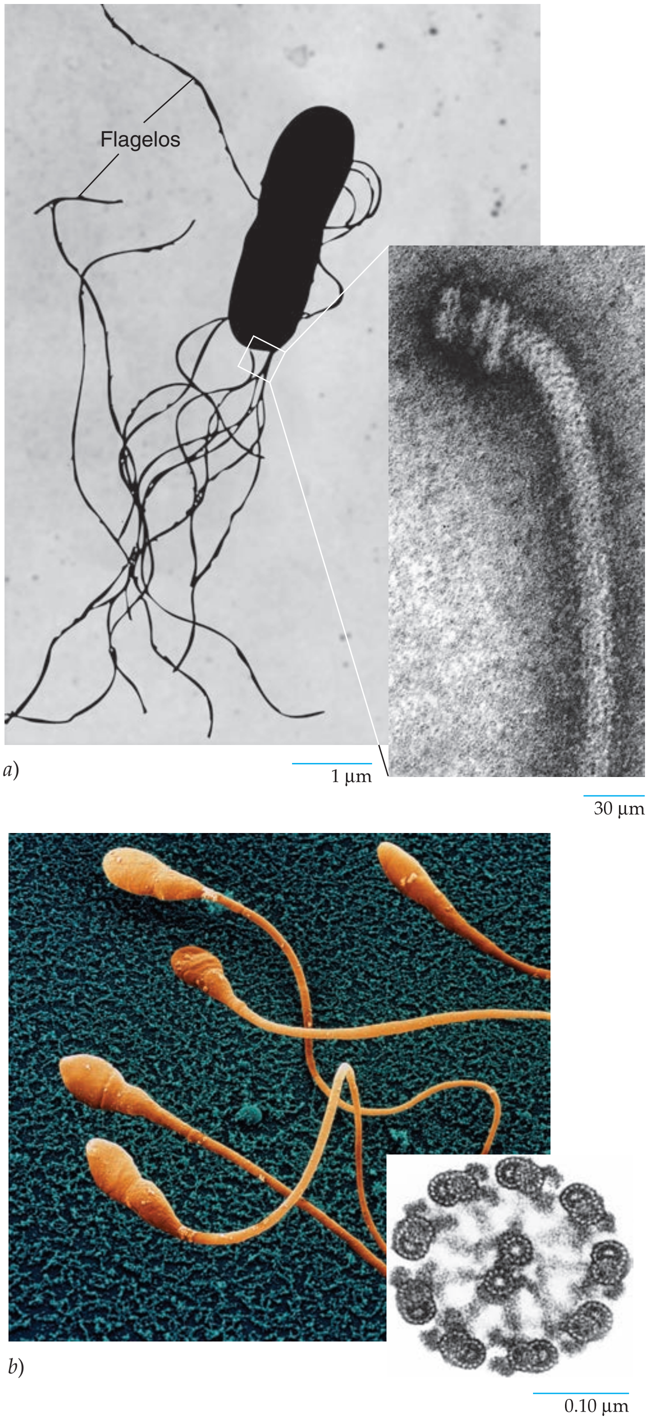



**FIGURA 1-14 Diferencia entre los flagelos procarióticos y los eucarióticos.** *a*) Bacteria *Salmonella* con sus numerosos flagelos. El recuadro muestra una vista de gran aumento de una porción de un solo flagelo bacteriano, que consiste en gran parte en una sola proteína llamada flagelina. *b*) Cada uno de estos espermatozoides humanos es impulsado por los movimientos ondulatorios de un único flagelo. El recuadro muestra una sección transversal del núcleo central de un flagelo de espermatozoide de mamífero. Los flagelos de las células eucariotas son tan similares, que esta sección podría haber sido tomada de un flagelo de protista o de alga verde.

FUENTE: *a*) Tomada de Bernard R. Gerber, Lewis M. Routledge y Shiro Takashima. *J Mol Biol* 1972;71:322, ©, con permiso de Elsevier; *b*) Juergen Berger/Photo Researchers, Inc. Recuadro: Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.

ejercen presión contra el fluido circundante, impulsando la célula a través del medio. Ciertas células eucariotas, incluidos muchos protistas y células espermáticas, también poseen flagelos, pero las versiones eucariotas son mucho más complejas que los simples filamentos proteicos de las bacterias (figura 1-14*b*) y generan movimiento por un mecanismo diferente.

En los párrafos anteriores, se mencionaron muchas de las diferencias más importantes entre los niveles procarióticos y eucarióticos de la organización celular. Muchos de estos puntos continuarán desarrollándose en los capítulos siguientes. Antes de asegurar que los procariotas son inferiores, téngase en cuenta que estos organismos han permanecido en la Tierra durante más de 3 000 millones de años, y en este momento miles de millones de ellos se están aferrando a la superficie externa de nuestro cuerpo y se alimentan de los nutrientes dentro de nuestro tracto digestivo. Pensamos en estos organismos como criaturas individuales y solitarias, pero conocimientos recientes han demostrado que viven en comunidades complejas y multiespecíficas llamadas *biopelículas*. La capa de placa que crece en nuestros dientes es un ejemplo de una biopelícula. Diferentes células en una biopelícula pueden llevar a cabo distintas actividades especializadas, al igual que las células en una planta o un animal. Considere también que, metabólicamente, los procariotas son organismos muy sofisticados y muy evolucionados. Por ejemplo, una bacteria como la *Escherichia coli*, habitante común tanto del tracto digestivo humano como del plato de cultivo del laboratorio, tiene la capacidad de vivir y prosperar en un medio que contiene uno o dos compuestos orgánicos de bajo peso molecular y algunos iones inorgánicos. Otras bacterias pueden vivir con una dieta que consiste únicamente en sustancias inorgánicas. Se ha encontrado una especie de bacteria en los pozos, a más de 1 000 m por debajo de la superficie de la Tierra, que vive en la roca basáltica y que producía hidrógeno molecular ($H_2$) debido a las reacciones inorgánicas que llevaba a cabo. Por el contrario, incluso las células más talentosas, desde el punto de vista metabólico que se hallan en nuestro cuerpo, requieren una variedad de compuestos orgánicos, entre los que se incluyen varias vitaminas y otras sustancias esenciales, que no pueden producir por sí mismas. De hecho, muchos de estos ingredientes dietéticos esenciales son producidos por las bacterias que normalmente viven en el intestino grueso.

**REPASO**

1. Compare una célula procariota y una eucariota en función de sus diferencias estructurales, funcionales y metabólicas.

## 1.4 Tipos de células procariotas

La distinción entre células procariotas y eucariotas se basa en la complejidad estructural (como se detalla en la tabla 1-1) y no en la relación filogenética. Las procariotas se dividen en dos grupos taxonómicos principales o dominios: Archaea (o arqueobacteria) y Bacteria (o eubacteria). Los miembros del Archaea están más estrechamente relacionados con las eucariotas que con el otro grupo de procariotas (Bacteria). Los experimentos que condujeron al descubrimiento de que la vida está representada por tres ramas distintas se discuten en "Vías experimentales", al final del capítulo.

### Dominio Archaea y dominio Bacteria

El dominio Archaea incluye varios grupos de organismos cuyos lazos evolutivos entre sí se revelan por similitudes en las secuencias de nucleótidos de sus ácidos nucleicos. Las especies de Archaea más conocidas viven en entornos extremadamente inhóspitos; a menudo se les denomina "extremófilos". Se incluyen dentro del dominio Archaea los metanógenos [procariotas capaces de convertir gases de $CO_2$ y de $H_2$ en gas metano ($CH_4$)], los halófilos (procariotas que viven en ambientes extremadamente salinos, como el Mar Muerto o ciertas reservas de salmuera de aguas profundas que poseen una salinidad equivalente a $MgCl_2$ 5M), los acidófilos (procariotas afines al ácido que prosperan a un pH tan bajo

como 0, igual al que se encuentra en los fluidos de drenaje de los pozos de minas abandonados) y termófilos (procariotas que viven a temperaturas muy altas). Incluidos en este último grupo se encuentran los hipertermófilos, que viven en los respiraderos hidrotermales del fondo del océano. El poseedor del récord más reciente en este grupo se ha llamado "cepa 121", porque es capaz de crecer y dividirse en agua sobrecalentada a una temperatura de 121 °C, precisamente la temperatura que se utiliza para esterilizar los instrumentos quirúrgicos en un autoclave. Los análisis recientes de los microbios del suelo y del océano indican que muchos miembros de las Archaea también se hallan como en casa en hábitats de temperatura, pH y salinidad normales.

Todas las demás procariotas se clasifican en el dominio Bacteria. Este dominio incluye la célula más pequeña conocida, el micoplasma (diámetro 0.2 μm), que es la única procariota conocida que carece de una pared celular y contiene un genoma con menos de 500 genes. El dominio Bacteria está presente en todos los hábitats imaginables de la Tierra, desde la plataforma de hielo permanente de la Antártida, hasta los desiertos africanos más secos, y hasta en los confines internos de las plantas y los animales. Incluso se ha encontrado que vive en capas de rocas situadas a varios kilómetros debajo de la superficie de la Tierra. Se cree que algunas de estas comunidades bacterianas han quedado aisladas de la vida en la superficie durante más de 100 millones de años. Las procariotas más complejas son las cianobacterias. Estas contienen series elaboradas de membranas citoplasmáticas que sirven como sitios de fotosíntesis (**FIGURA 1-15*a***). Las membranas de las cianobacterias son muy similares a las membranas fotosintéticas presentes en los cloroplastos de las células vegetales. Al igual que en las plantas eucariotas, la fotosíntesis en las cianobacterias se logra al dividir las moléculas de agua, lo que libera oxígeno molecular.

Muchas cianobacterias son capaces no solo de realizar la fotosíntesis, sino también la **fijación de nitrógeno**, la conversión de nitrógeno gaseoso ($N_2$) a formas reducidas de nitrógeno (como amoniaco, $NH_3$) que pueden ser utilizadas por las células en la síntesis de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, incluidos aminoácidos y nucleótidos. Aquellas especies capaces de realizar la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno pueden sobrevivir con pocos recursos, luz, $N_2$, $CO_2$ y $H_2O$. No es sorprendente, por tanto, que las cianobacterias sean, por lo general, los primeros organismos en colonizar las rocas desnudas desprovistas de formas de vida, tras una erupción volcánica abrasadora. Otro hábitat inusual ocupado por cianobacterias se ilustra en la figura 1-15*b*).



*a*)



*b*)

**FIGURA 1-15 Cianobacterias.** *a*) Micrografía electrónica de una cianobacteria, en la que se muestran las membranas citoplasmáticas que realizan la fotosíntesis. Estas membranas concéntricas son muy similares a las membranas tilacoides presentes en los cloroplastos de las células vegetales, un recordatorio de que los cloroplastos evolucionaron a partir de una cianobacteria simbiótica. *b*) Las cianobacterias que viven dentro de los pelos de estos osos polares son responsables del inusual color verdoso de su pelaje.

FUENTE: *a*) Cortesía de Norma J. Lang. *b*) Cortesía de Zoological Society of San Diego.

## Diversidad de las procariotas

La mayoría de los microbiólogos solo están familiarizados con los microorganismos que pueden crecer en un medio de cultivo. Cuando un paciente que sufre una infección del tracto respiratorio o urinario va al médico, uno de los primeros pasos que se suele seguir es cultivar el patógeno. Una vez que se ha cultivado, el organismo puede identificarse, y prescribirse el tratamiento adecuado. Se ha demostrado que es relativamente fácil cultivar la *mayoría* de los procariotas que causan enfermedades, pero no ocurre lo mismo con los que viven en libertad en la naturaleza. El problema se complica por el hecho de que los procariotas son apenas visibles en un microscopio óptico y su morfología a menudo no es muy distintiva. Hasta la fecha, alrededor de 6 000 especies de procariotas han sido identificadas mediante técnicas tradicionales, lo que representa menos de una décima parte de 1% de los millones de especies procarióticas que se cree existen en la Tierra. Nuestra apreciación acerca de la diversidad de las comunidades procariotas ha aumentado radicalmente en los últimos años con el uso de técnicas moleculares que no requieren el aislamiento de un organismo en particular.

Supongamos que se quisiera aprender sobre la diversidad de procariotas que viven en las capas superiores del océano Pacífico frente a las costas de California. En lugar de tratar de cultivar estos organismos, lo que resultaría en gran medida inútil, un investigador podría concentrar las células de una muestra de agua del océano, extraer el DNA y analizar ciertas secuencias de DNA presentes en la preparación. Todos los organismos comparten ciertos genes, como los que codifican los RNA presentes en los ribosomas o en las enzimas de ciertas vías metabólicas. Aunque todos los organismos pueden compartir dichos genes, las secuencias de los nucleótidos que componen los genes varían de modo considerable de una especie a otra. Esta es la base de la evolución biológica. Al usar técnicas que revelan la variedad de secuencias de DNA de un gen particular en un hábitat específico, se aprende directamente sobre la diversidad de especies que viven en ese hábitat. Las técnicas recientes de secuenciación se han vuelto tan rápidas y económicas, que casi todos los genes presentes en los microbios de un hábitat determinado pueden secuenciarse, lo que genera un genoma colectivo o *metagenoma*. Este enfoque puede proporcionar información sobre los tipos de proteínas que estos organismos fabrican y, por consiguiente, sobre muchas de las actividades metabólicas en las que interactúan.

Estas mismas estrategias moleculares se están utilizando para explorar la notable pluralidad entre los billones de "pasajeros invisibles" que viven en, o dentro de, nuestros propios cuerpos, en hábitats como el tracto intestinal, la boca, la vagina y la piel. Esta colección de microbios, que se conoce como *microbioma* humano, es objeto de varios esfuerzos internacionales de investigación des-

**TABLA 1-2 Número y biomasa de procariotas en el medio ambiente mundial**

| Medio ambiente | Núm. de células procariotas, × $10^{28}$ | Pg de C en procariotas* |
|---|---|---|
| Hábitats acuáticos | 12 | 2.2 |
| Superficie oceánica marina | 355 | 303 |
| Suelo terrestre | 26 | 26 |
| Capa profunda de la superficie terrestre | 25-250 | 22-215 |
| Total | 415-640 | 353-546 |

* 1 petagramo (Pg) = $10^{15}$ g.
*Fuente:* W. B. Whitman, *et al. Proc Nat'l Acad Sci USA*, 1998;95:6581.

tinados a identificar y caracterizar estos organismos en personas de diferentes edades, dietas, geografía y estado de salud. Ya se ha demostrado, por ejemplo, que los humanos obesos y delgados tienen poblaciones de bacterias marcadamente distintas en sus tractos digestivos. A medida que las personas obesas pierden peso, su perfil bacteriano se desplaza hacia el de las personas más delgadas. Un estudio reciente de muestras fecales tomadas de 124 personas de disímiles pesos reveló la presencia dentro de la población colectiva de más de 1 000 especies diferentes de bacterias. Tomados en conjunto, estos microbios contenían más de tres millones de genes distintos, aproximadamente 150 veces más que el número presente en el genoma humano. Entre las funciones de las proteínas codificadas por estos genomas microbianos están la síntesis de vitaminas, la descomposición de azúcares vegetales complejos y la prevención del crecimiento de organismos patógenos.

Mediante el uso de técnicas moleculares basadas en la secuencia, los biólogos han descubierto que la mayoría de los hábitats en la Tierra están llenos de vida procariótica no reconocida previamente. Una estimación del gran número de procariotas en los principales hábitats de la Tierra se da en la tabla 1-2. Es digno de mención que ahora se cree que más de 90% de estos organismos viven en los sedimentos subsuperficiales, muy por debajo de los océanos y las capas superiores del suelo. ¡Los nutrientes pueden ser tan escasos en algunos de estos sedimentos profundos que se cree que los microbios que viven allí se dividen solo una vez cada varios cientos de años! La tabla 1-2 también muestra un estimado de la cantidad de carbono que incorpora el mundo de las células procariotas. Para poner este número en términos más familiares, es más o menos comparable con la cantidad total de carbono presente en toda la vida vegetal del mundo.

### REPASO

1. ¿Qué grupo de procariotas es más conocido por contener muchos extremófilos?

## 1.5 Tipos de células eucariotas

En muchos aspectos, las células eucariotas más complejas no se encuentran dentro de plantas o animales, sino más bien entre los protistas de una única célula (*unicelulares*), como los que se muestran en la **FIGURA 1-16**. Toda la maquinaria necesaria para las complejas actividades en las que se desenvuelve este organismo —percibir el entorno, atrapar alimentos, expulsar el exceso de líquido, evadir a los depredadores— se encuentra dentro de los confines de una sola célula.

### Diferenciación celular

Los organismos unicelulares complejos representan una vía evolutiva. Una vía alternativa ha llevado a la evolución de organismos multicelulares, en los cuales diferentes tipos de células especializadas realizan diversas actividades. Las células especializadas se forman por un proceso llamado **diferenciación**. Un óvulo humano fertilizado, por ejemplo, progresará a lo largo de un curso de desarrollo embrionario que conduce a la formación de aproximadamente 250 tipos distintos de células diferenciadas. Algunas células se vuelven parte de una glándula digestiva particular, otras conforman un músculo esquelético grande, otras forman parte de un hueso, y así sucesivamente (**FIGURA 1-17**). La vía de diferenciación seguida por cada célula embrionaria depende sobre todo de las señales que recibe del entorno circundante; estas señales a su vez dependen de la posición de esa célula dentro del embrión. Como se analiza más adelante en "Perspectiva humana", los investigadores están aprendiendo cómo controlar el proceso de diferenciación en el plato de cultivo, y a aplicar este conocimiento en el tratamiento de enfermedades humanas complejas.

Como resultado de la diferenciación, diversos tipos de células adquieren un aspecto distintivo y contienen materiales únicos. Las células del músculo esquelético poseen una red de filamentos alineados con precisión, compuestos por proteínas contráctiles únicas; las células del cartílago se rodean de una matriz característica que contiene polisacáridos y la proteína colágeno, que en conjunto proporcionan soporte mecánico; los glóbulos rojos se convierten en sacos en forma de disco llenos de una sola proteína, la hemoglobina, que transporta oxígeno; etc. A pesar de sus muchas diferencias, las diversas células de una planta o animal multicelular están compuestas por organelos similares. Las mitocondrias, por ejemplo, se encuentran en esencia en todos los ti-

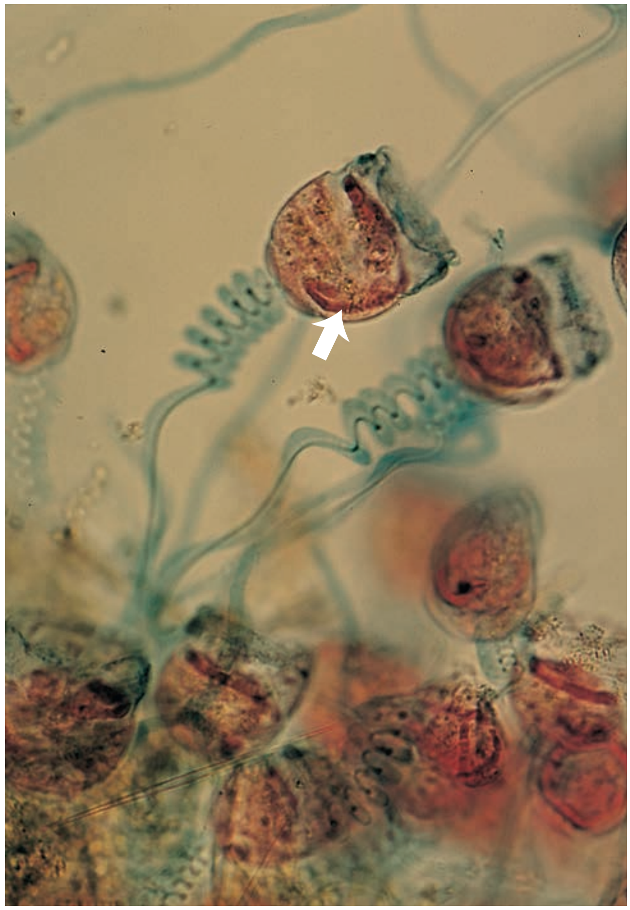


**FIGURA 1-16** ***Vorticella*, un protista ciliado complejo.** Algunos de estos organismos unicelulares pueden verse aquí; la mayoría tiene contraídas sus "cabezas" debido al acortamiento de la banda contráctil en su tallo teñida de azul. Cada célula tiene un único núcleo grande, llamado macronúcleo (flecha), el cual contiene muchas copias de los genes.

FUENTE: Carolina Biological Supply Co./Phototake.

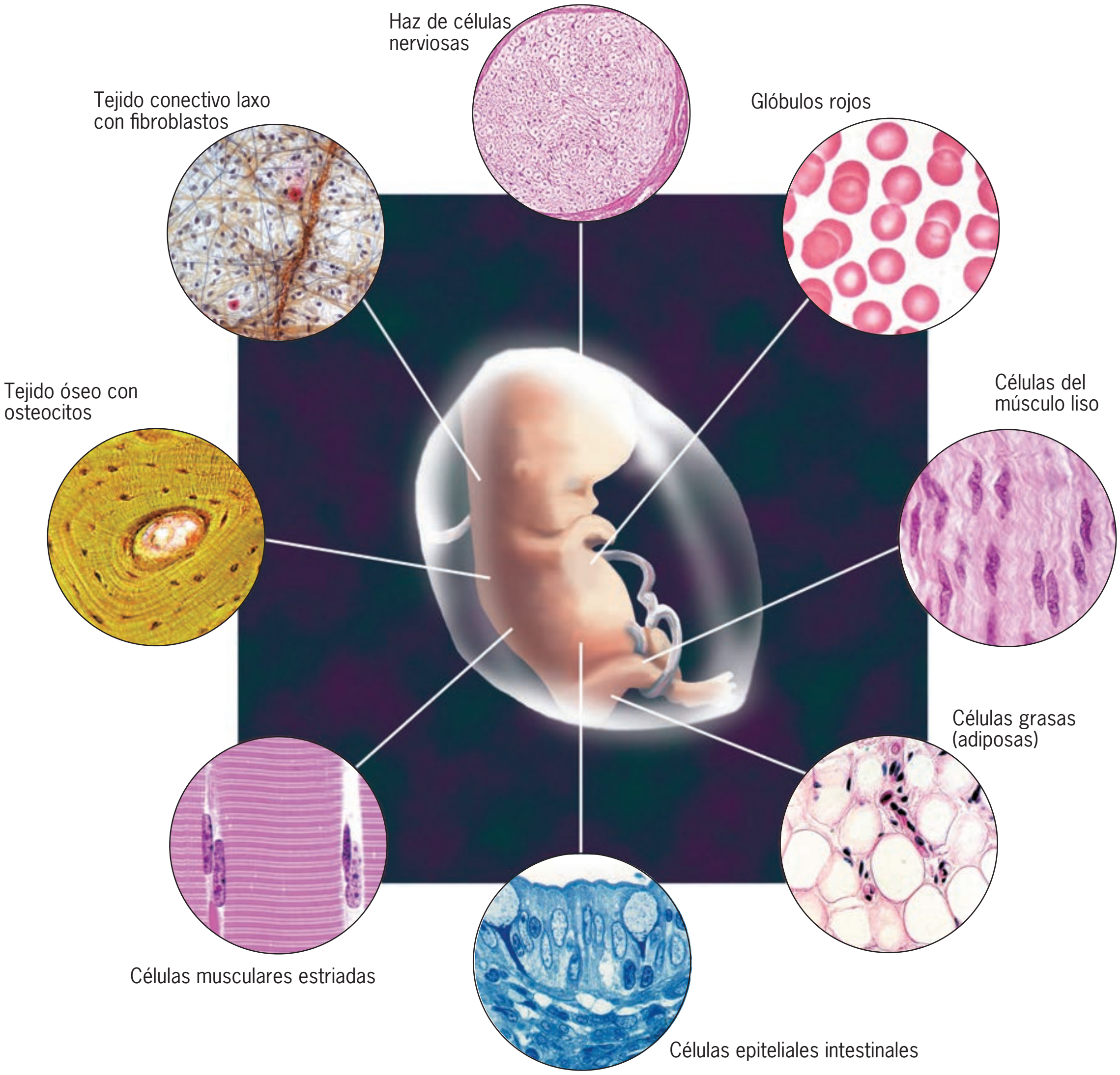



**FIGURA 1-17 Vías de diferenciación celular.** Algunos de los tipos de células diferenciadas presentes en un feto humano.
FUENTE: Micrografía cortesía de Michael Ross, Universidad de Florida.

pos de células. Sin embargo, en un tipo pueden tener una forma redondeada, mientras que en otro pueden ser muy alargadas y filiformes. En cada caso, el número, la apariencia y la ubicación de los diversos organelos pueden correlacionarse con las actividades del tipo de célula particular. Se puede hacer una analogía con una variedad de piezas orquestales: todas están compuestas por las mismas notas, pero la disposición variable da a cada una su carácter y belleza únicos.

## Organismos modelo

Los organismos vivos son muy diversos, y los resultados obtenidos de un análisis experimental específico pueden depender del organismo particular que se estudia. Como resultado, los biólogos celulares y moleculares han centrado considerables actividades de investigación en un pequeño número de organismos "representativos" u **organismos modelo**. De ello se espera que un cuerpo detallado de conocimiento construido sobre estos estudios proporcione un marco para comprender los procesos básicos que comparten la mayoría de los organismos, en especial, los humanos. Esto no sugiere que muchos otros organismos no sean ampliamente utilizados en el estudio de la biología celular y molecular. Sin embargo, seis organismos modelo —uno procariota y cinco eucariotas— han captado gran parte de la atención: una bacteria, *E. coli*; una levadura germinada, *Saccharomyces cerevisiae*; una planta floreciente, *Arabidopsis thaliana*; un nematodo, *Caenorhabditis elegans*; una mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y un ratón, *Mus musculus*. Cada uno de estos organismos tiene ventajas específicas que lo hacen particularmente útil como sujeto de investigación para responder ciertos tipos de preguntas. Cada uno de ellos se muestra en la **FIGURA 1-18**, y algunas de sus ventajas como sistemas de investigación se describen en la leyenda que los acompaña. En este texto nos concentraremos en los resultados obtenidos de estudios sobre sistemas de mamíferos —principalmente el ratón y células de mamíferos cultivadas— porque estos hallazgos son más aplicables a los humanos. Pero una gran parte de lo que sabemos sobre las células de mamíferos se descubrió, por primera vez, mediante experimentos en otros organismos modelo con los cuales es más fácil trabajar. Por tanto, tendremos muchas ocasiones para describir la investigación llevada a cabo en las células de otras especies. Puede que sorprenda descubrir cuán similares somos, a nivel celular y molecular, a estos organismos mucho más pequeños y simples.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la importancia de la diferenciación celular?

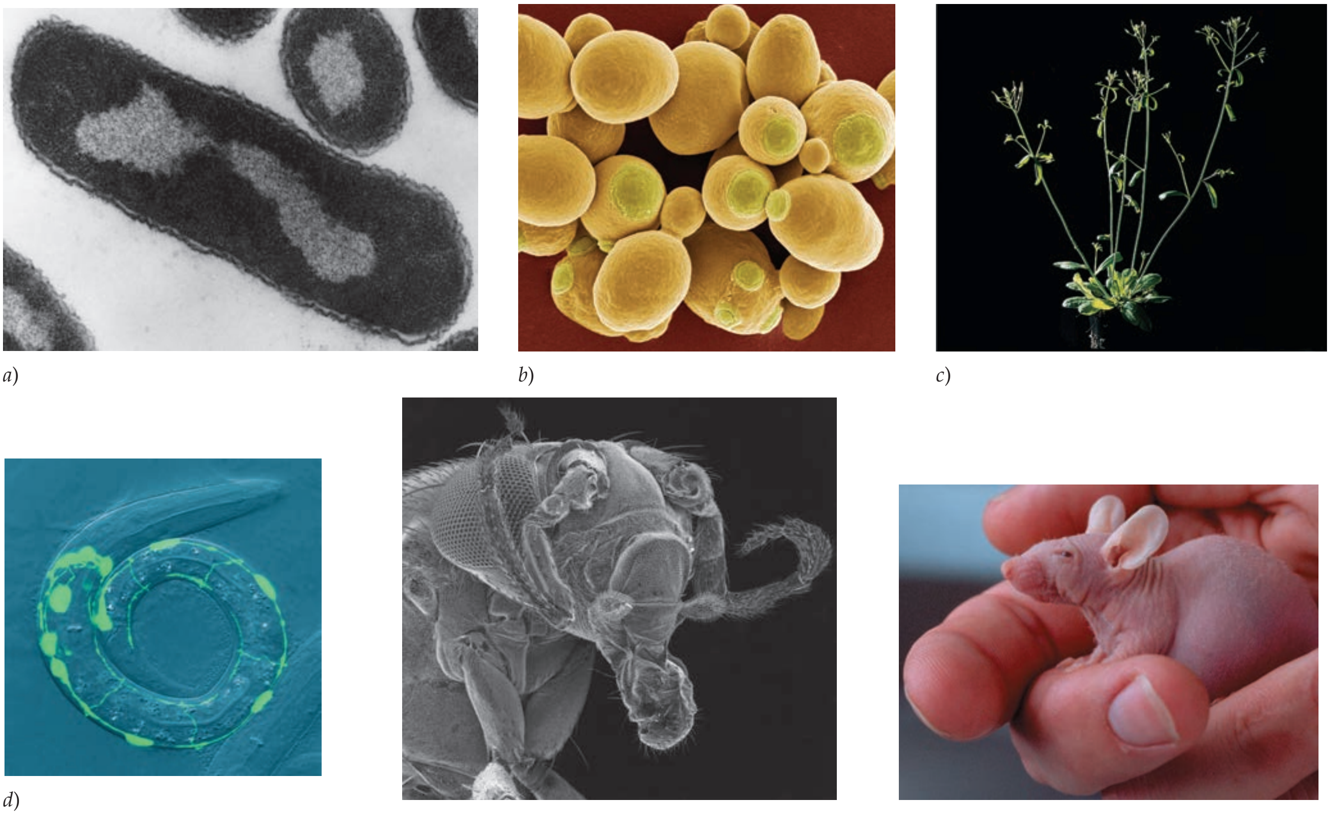



**FIGURA 1-18 Seis organismos modelo.** *a*) *Escherichia coli* es una bacteria de forma alargada que vive en el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos. Gran parte de lo que analizaremos sobre la biología molecular básica de la célula, incluidos los mecanismos de replicación, transcripción y traducción, se elaboró, en un inicio, a partir de este único organismo procariota. La organización relativamente simple de una célula procariota se ilustra en esta micrografía electrónica. *b*) *Saccharomyces cerevisiae*, por lo común más conocida como levadura de pan o levadura de cerveza. Es la menos compleja de las eucariotas por lo general estudiadas; sin embargo, contiene un número sorprendente de proteínas que son homólogas a las proteínas de las células humanas. Estas proteínas normalmente conservan su función en los dos organismos. La especie posee un pequeño genoma que codifica alrededor de 6 200 proteínas; puede cultivarse en un estado haploide (una copia de cada gen por célula, en lugar de dos, como en la mayoría de las células eucariotas) y en condiciones aerobias (que contienen $O_2$) o anaerobias (sin $O_2$). Es ideal para la identificación de genes a través del uso de mutantes. *c*) *Arabidopsis thaliana*, una hierba (llamada berro de thale), relacionada con la mostaza y la col, que tiene un genoma inusualmente pequeño (120 millones de pares de bases) para una planta en flor, un tiempo de generación rápida y una gran producción de semillas, y que crece a una altura de solo unas pocas pulgadas. *d) Caenorhabditis elegans*, un nematodo de tamaño microscópico, consistente en un número definido de células (cerca de 1 000), cada una de las cuales se desarrolla según un patrón preciso de divisiones celulares. El animal se cultiva fácilmente, se puede mantener vivo en un estado congelado, tiene una pared corporal transparente, un tiempo de generación corto y es manejable para el análisis genético. Esta micrografía muestra el sistema nervioso larval, que ha sido marcado con proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*). Los investigadores pioneros en su estudio recibieron el Premio Nobel en 2002. *e*) *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta, es una eucariota pequeña, pero compleja, que se cultiva con facilidad en el laboratorio, donde crece de un huevo a adulto en cuestión de días. La *Drosophila* ha sido un animal predilecto para el estudio de la genética, la biología molecular del desarrollo y la base neurológica del comportamiento simple. Ciertas células larvales tienen cromosomas gigantes, cuyos genes individuales pueden identificarse para estudios de evolución y expresión genética. En la mosca mutante que se muestra aquí, se ha desarrollado una pata en el lugar donde estaría una antena en una mosca normal (tipo salvaje). *f*) *Mus musculus*, el ratón común de la casa, se guarda y cría de manera factible en el laboratorio. Se han desarrollado miles de diferentes cepas genéticas, muchas de las cuales se almacenan simplemente como embriones congelados debido a la falta de espacio para alojar a los animales adultos. El "ratón desnudo" que se muestra aquí se desarrolla como animal atímico y, por tanto, puede aceptar injertos de tejido humano que no son rechazados.

FUENTE: *a*) Biophoto Associates/Photo Researchers; *b*) Biophoto Associates/Photo Researchers; *c*) cortesía de Erik Jorgensen, Universidad de Utah. Tomada de *Trends Genetics*, vol. 14, Cover#12, 1998, con permiso de Elsevier; *d*) cortesía de Erik Jorgensen, Universidad de Utah. Tomada de *Trends Genetics*, vol. 14, Cover#12, 1998, con permiso de Elseviere: David Scharf/Photo Researchers, Inc. *f*) Ted Spiegel/© Corbis Images.

# 1.6 PERSPECTIVA HUMANA

## Perspectiva de la terapia de reemplazo celular

Muchas enfermedades humanas se deben a la muerte de tipos específicos de células. La diabetes tipo 1, por ejemplo, es consecuencia de la destrucción de las células beta en el páncreas; la enfermedad de Parkinson ocurre con la pérdida de neuronas productoras de dopamina en el cerebro, y la insuficiencia cardiaca se puede remontar a la muerte de las células del músculo cardiaco (cardiomiocitos) en el corazón. Imagine las posibilidades de poder aislar células de un paciente, convertirlas en las células que dicho paciente necesita, y luego volver a infundírselas para restaurar la función perdida del cuerpo. Estudios recientes han dado esperanza a los investigadores de que algún día este tipo de terapia será un lugar común. Para comprender mejor el con-

(*continúa*)

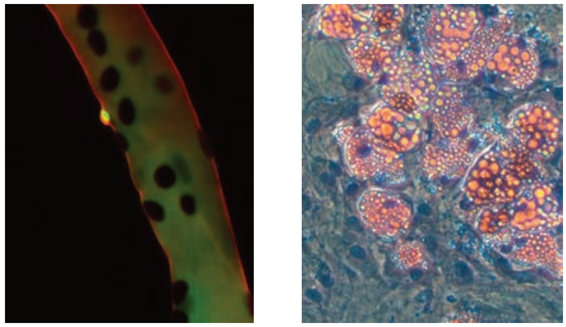
cepto de terapia de reemplazo celular, se puede considerar un procedimiento ampliamente utilizado en la práctica actual, conocido como *transplante de médula ósea*, en el que las células se extraen de los huesos pélvicos de un donante y se infunden en el cuerpo de un receptor.

El trasplante de médula ósea se usa con más frecuencia para tratar los linfomas y las leucemias, que son cánceres que afectan la naturaleza y la cantidad de los glóbulos blancos. Para llevar a cabo el procedimiento, el paciente está expuesto a un alto nivel de radiación y/o químicos tóxicos, que mata las células cancerosas, pero también a todas las células involucradas en la formación de glóbulos rojos y blancos. Dicho efecto se debe a que las células formadoras de sangre son particularmente sensibles a la radiación y los productos químicos tóxicos. Una vez que las células formadoras de sangre de una persona han sido destruidas, son reemplazadas por células de médula ósea trasplantadas de un donante sano. La médula ósea es capaz de regenerar el tejido sanguíneo del receptor del trasplante, porque contiene un pequeño porcentaje de células que pueden proliferar y reabastecer el tejido de la médula ósea que forma la sangre del paciente.[1] Estas células formadoras de sangre en la médula ósea se denominan **células madre hematopoyéticas** (o **HSC**, *hematopoietic stem cells*), y fueron descubiertas a principios de la década de 1960 por Ernest McCulloch y James Till, en la Universidad de Toronto. Las HSC son responsables de reemplazar los millones de glóbulos rojos y blancos que envejecen y mueren cada minuto en nuestros cuerpos (véase figura 17-6). De manera extraordinaria, una única HSC es capaz de reconstituir todo el sistema hematopoyético (formador de sangre) de un ratón irradiado. Un número cada vez mayor de padres está guardando la sangre del cordón umbilical de su bebé recién nacido como un tipo de "póliza de seguro de células madre", en caso de que el niño alguna vez desarrolle una enfermedad que pueda tratarse mediante la administración de HSC. Ahora que hemos descrito un tipo de terapia de reemplazo celular, podemos considerar varios otros tipos que tienen un potencial terapéutico mucho más amplio. Dividiremos estas terapias potenciales en cuatro tipos.

## Células madre adultas

Las células madre hematopoyéticas en la médula ósea son un ejemplo de una célula madre *adulta*. Las **células madre** se definen como células indiferenciadas que 1) son capaces de autorrenovarse, es decir, producir más células como ellas mismas, y 2) son multipotentes, es decir, son capaces de diferenciarse en dos o más tipos de células maduras. Las HSC de la médula ósea son solo un tipo de célula madre adulta. La mayoría, si no todos, de los órganos en un adulto humano contienen células madre que son capaces de reemplazar las células particulares del tejido en el que se encuentran. Incluso el cerebro adulto, que no se conoce por su capacidad de regeneración, contiene células madre que pueden generar nuevas neuronas y células gliales (las células de apoyo del cerebro). La **FIGURA 1*a*)** muestra una célula madre aislada presente en el músculo esquelético adulto; se cree que estas "células satélite", como se les denomina, se dividen y diferencian, según sea necesario, para reparar el tejido muscular lesionado. La figura 1*b*) muestra un cultivo de células adiposas (grasas) que se han diferenciado *in vitro* de células madre adultas que están presentes en el tejido graso.

El corazón humano adulto contiene células madre que son capaces de diferenciarse en las células que forman el tejido muscular del corazón (los cardiomiocitos del miocardio) y los vasos sanguíneos del corazón. Se esperaba que estas células madre cardiacas pudieran tener la posibilidad de regenerar tejido cardiaco sano en pacientes que habían sufrido un ataque cardiaco grave. Al parecer, esta esperanza cristalizó a partir de la aparición de dos informes históricos, a finales de 2011, sobre los resultados de los ensayos clínicos de pacientes que habían sufrido daños significativos en el tejido cardiaco después de un ataque cardiaco. Las células madre de cada uno de los pacientes se co-



*a*) *b*)

**FIGURA 1 Una célula madre muscular adulta**. *a*) Una porción de una fibra muscular, con muchos núcleos teñidos de azul. Se observa que una única célula madre (amarilla) se aloja entre la superficie externa de la fibra muscular y una capa extracelular (o membrana basal), que está teñida de rojo. La célula madre indiferenciada exhibe este color amarillo, porque expresa una proteína que no está presente en la fibra muscular diferenciada. *b*) Células madre adultas que se diferencian en células adiposas (grasas) en cultivo. Las células madre capaces de este proceso están presentes en el tejido adiposo adulto y también en la médula ósea.

FUENTE: *a*) Tomada de Charlotte A. Collins, *et al*. *Cell* 2005;122:291; con permiso de Elsevier; *b*) cortesía de Thermo Fisher Scientific, tomada de *Nature,* 2008;451:855.

secharon durante las cirugías cardiacas, se expandieron en número a través del cultivo *in vitro*, y luego se infundieron de nuevo en el corazón de cada paciente. Durante los siguientes meses, la mayoría de los pacientes tratados experimentaron un reemplazo significativo (p. ej., 50%) del músculo cardiaco dañado, por tejido sano derivado de las células madre infundidas. Esta regeneración del tejido cardiaco se acompañó de una clara mejoría en la calidad de vida, en comparación con los pacientes en el grupo placebo que no recibieron células madre. Las células madre adultas son un sistema ideal para terapias de reemplazo celular, porque representan un tratamiento *autólogo*; es decir, las células se toman del mismo paciente en el que se usan. En consecuencia, estas células madre no enfrentan la perspectiva del rechazo inmune. Estos maravillosos resultados con las células madre cardiacas reavivaron el interés por las células madre adultas, que había disminuido después de una serie de intentos fallidos de dirigir las células madre aisladas de la médula ósea, para regenerar los tejidos enfermos. La gran mayoría de las terapias de células madre adultas en desarrollo usan un tipo de célula madre adulta conocida como célula madre mesenquimal (MSC, *mesenchymal stem cell*). Estas se pueden obtener a partir de la médula ósea, pero son diferentes de las HSC discutidas anteriormente, porque no producen células sanguíneas, sino más bien una variedad de otros tipos de células que se encuentran en diversos tejidos y órganos. Las MSC también se pueden conseguir a partir del tejido graso obtenido durante los procedimientos de liposucción. En la actualidad, hay en curso con más de 100 ensayos clínicos controlados para tratar una amplia gama de padecimientos con células derivadas de MSC, que incluyen enfermedades del corazón, diabetes y enfermedades inmunes como el lupus y la enfermedad de Crohn. Una terapia basada en MSC llamada "Prochymal" se convirtió en la primera terapia de células madre aprobada por la FDA. Se usa para tratar la enfermedad de Crohn, así como para las reacciones inmunes que pueden ocurrir en pacientes que han recibido trasplante de médula ósea.

## Células madre embrionarias

Gran parte de la expectación que se ha generado en este campo durante los últimos 10 o 20 años proviene de los estudios sobre **células madre embrionarias** (**ES**, *embryonic stem cells*), que son un tipo de células madre aisladas de embriones de mamíferos muy jóvenes (**FIGURA 2*a***). Estas son las células en el embrión

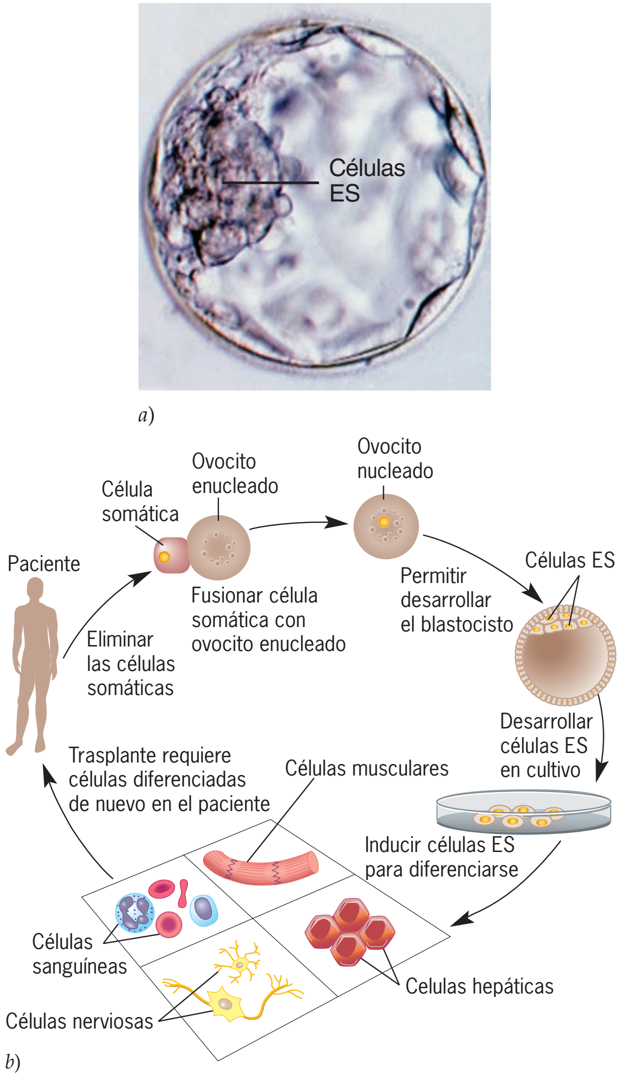



**FIGURA 2 Células madre embrionarias, su aislamiento y uso potencial.** *a*) Micrografía de un blastocisto de mamífero, una etapa temprana durante el desarrollo embrionario, que muestra la masa celular interna, que se compone de células ES pluripotentes. Una vez aisladas, tales células crecen fácilmente en cultivo. *b*) Un procedimiento posible para obtener células diferenciadas que puedan utilizarse en la terapia de reemplazo celular. Se extrae una pequeña porción de tejido del paciente, y una de las células somáticas se fusiona con un ovocito del donante, cuyo núcleo se había eliminado previamente. El ovocito resultante (huevo), con el núcleo de la célula del paciente, se desarrolla en un embrión temprano, y las células ES se recogen y crecen en cultivo. Se induce una población de células ES para que se diferencien en las células requeridas, las que luego se trasplantan al paciente para restaurar la función del órgano. (En este momento, no ha sido posible obtener embriones en estadio de blastocisto, es decir, aquellos con células ES, de ninguna especie de primates, a través del procedimiento que se muestra aquí, aunque se ha logrado usando un ovocito del cual no se ha extraído primero el núcleo. Las células ES que se generan en tales experimentos son triploides; es decir, tienen tres copias de cada cromosoma —una del ovocito y dos del núcleo del donante— en lugar de dos, como sería normalmente el caso. De todos modos, estas células triploides ES son pluripotentes y capaces de trasplante).

FUENTE: © Phanie/SuperStock

temprano que dan lugar a todas las diversas estructuras del feto mamífero. A diferencia de las células madre adultas, las células ES son *pluripotentes*; es decir, son capaces de diferenciarse en cada tipo de célula en el cuerpo. En la mayoría de los casos, las células ES humanas se han aislado a partir de embriones proporcionados por clínicas de fertilización *in vitro*. En todo el mundo están disponibles para la investigación experimental docenas de líneas celulares ES humanas genéticamente distintas, cada una derivada de un solo embrión.

El objetivo a largo plazo de los investigadores clínicos es aprender cómo convencer a las células ES para que, en un cultivo, se diferencien en cada uno de los muchos tipos de células que podrían usarse para la terapia de reemplazo celular. Se han realizado progresos considerables hacia este fin, y numerosos estudios han demostrado que los trasplantes de células diferenciadas derivadas de ES pueden mejorar la condición de los animales con órganos enfermos o dañados. La primera prueba en humanos comenzó en 2009, en pacientes que habían experimentado lesiones debilitantes de la médula espinal. El ensayo para tratar las lesiones de la médula espinal utilizó células llamadas oligodendrocitos, que producen las vainas de mielina que se envuelven alrededor de las células nerviosas (véase figura 4-5). Los oligodendrocitos trasplantados en estos pacientes se diferenciaron de las células ES humanas que se cultivaron en un medio que contenía insulina, hormona tiroidea y una combinación de ciertos factores de crecimiento. Se ha encontrado que este protocolo de cultivo particular dirige la diferenciación de células ES hacia oligodendrocitos, en lugar de cualquier otro tipo de célula. Lamentablemente, no se informó una mejoría significativa en los pacientes tratados, y la compañía que realizó el ensayo decidió dejar de participar en este esfuerzo.

La terapia con células madre embrionarias se encuentra en la actualidad bajo intenso estudio como tratamiento para enfermedades degenerativas de la retina, entre ellas, la degeneración macular. En el momento de escribir estas líneas, existen ocho ensayos clínicos aprobados por el gobierno, que usan células ES inducidas para diferenciarse en células epiteliales pigmentadas de la retina, un tipo de célula clave dentro de la retina, en un intento por curar diferentes formas de degeneración retiniana.

El principal riesgo del uso terapéutico de células ES es la presencia inadvertida de células ES indiferenciadas entre la población celular diferenciada. Las células ES indiferenciadas son capaces de formar un tipo de tumor benigno, llamado teratoma, que puede contener una extraña masa de diversos tejidos diferenciados, incluidos el cabello y los dientes. La formación de un teratoma dentro del sistema nervioso central podría tener consecuencias graves. Además, el cultivo de células ES en el presente implica el uso de materiales biológicos no humanos, lo que también plantea riesgos potenciales.

Las células ES utilizadas en estos ensayos iniciales se derivaron de líneas de células que se habían aislado de embriones humanos no relacionados con los pacientes que estaban siendo tratados. Tales células enfrentan la posibilidad de rechazo inmunológico por parte del receptor del trasplante. Sin embargo, es posible "personalizar" las células ES, para que tengan la misma composición genética del individuo que está siendo tratado. Esto podrá lograrse algún día, mediante un procedimiento indirecto denominado *transferencia nuclear de células somáticas* (*SCNT, somatic cell nuclear transfer*), el cual se muestra en la figura 2*b*, que comienza con un óvulo no fertilizado, una célula que se obtiene de los ovarios de una donante no relacionada. En este enfoque, el núcleo del huevo no fertilizado sería reemplazado por el núcleo de una célula del paciente a tratar, lo que haría que el huevo tuviera la misma composición cromosómica que la del paciente. Luego se permitiría que el huevo se desarrollara en una etapa embrionaria temprana, y las células ES se eliminarían, se cultivarían y se induciría su diferenciación en el tipo de células que necesita el paciente. Debido a que este procedimiento involucra la formación de un embrión humano que se usa solo como fuente de células ES, existen importantes cuestiones éticas que deben resolverse antes de que pueda practicarse de manera rutinaria. Además, el proceso de SCNT es tan costoso y exigente desde el punto de vista técnico, que es muy improbable que alguna vez se pueda practicar como parte de un tratamiento médico de rutina. Lo posible es que, si alguna vez se practica la terapia

(*continúa*)

basada en células ES, dependerá del uso de un banco de cientos o miles de células ES diferentes. Tales bancos podrían contener células con compatibilidad hística suficiente, de modo que sean adecuadas para su uso en la mayor parte de los pacientes.

### Células madre pluripotentes inducidas

Durante mucho tiempo se pensó que el proceso de diferenciación celular en los mamíferos era irreversible: una vez que una célula se había convertido en un fibroblasto, o en un glóbulo blanco, o en una célula de cartílago, nunca más se podría revertir a ningún otro tipo de célula. Este concepto se echó por tierra en 2006, cuando Shinya Yamanaka y colaboradores de la Universidad de Kyoto anunciaron un sorprendente descubrimiento; su laboratorio había logrado reprogramar una célula de ratón completamente diferenciada —en este caso un tipo de fibroblasto de tejido conjuntivo— en una célula madre pluripotente. Lograron la hazaña al introducir en el fibroblasto de ratón los genes que codificaban cuatro proteínas clave que son características de las células ES. Se cree que estos genes (*Oct4, Sox2*, *Klf4* y *Myc*, conocidos colectivamente como OSKM) desempeñan un papel clave en el mantenimiento de las células en un estado indiferenciado y les permiten continuar su autorrenovación. Los genes se introdujeron en fibroblastos cultivados usando virus portadores de genes, y aquellas células raras que se reprogramaron se seleccionaron de otras en el cultivo, mediante técnicas especializadas. Este nuevo tipo de células se denominó *células pluripotentes inducidas* (células iPS, *induced pluripotent cells*) y demostró que era en realidad pluripotente, cuando se inyectó en un blastocisto de ratón y se descubrió que participaba en la diferenciación de todas las células del cuerpo, incluidos los óvulos y los espermatozoides. Al cabo de un año más o menos, la misma hazaña de reprogramación se había logrado en varios laboratorios con células humanas. Lo que esto significa es que los investigadores tienen ahora a su disposición un suministro ilimitado de células pluripotentes, que pueden dirigirse para diferenciarse en varios tipos de células corporales, utilizando protocolos experimentales similares a los ya desarrollados para las células ES.

De hecho, las células iPS ya se han utilizado para corregir ciertas enfermedades en animales de experimentación, incluida la anemia de células falciformes en ratones, como se muestra en la **FIGURA 3**. Con base en los prometedores resultados de los experimentos con animales, los intentos de usar células iPS en pacientes están comenzando. El primer ensayo clínico de una terapia basada en células iPS se inició en 2014. Al igual que en los ensayos en curso con células madre embrionarias mencionados anteriormente, este otro ensayo está probando el uso de células epiteliales pigmentadas retinianas derivadas de células iPS, para tratar la degeneración macular. Los resultados de dicho ensayo no estaban disponibles en el momento de escribir este artículo.

La utilidad de las células iPS puede extenderse mucho más allá de la terapia de reemplazo celular. Las células iPS también se han preparado a partir de células adultas tomadas de pacientes con una multitud de trastornos genéticos. De esta manera, los investigadores pueden seguir la diferenciación de estas células iPS cultivadas en los tipos celulares especializados que se ven afectados por la enfermedad en particular. Se espera que tales estudios revelen los mecanismos de formación de la enfermedad, a medida que esta se desarrolla en un plato de cultivo, como ocurriría normalmente de una manera que no podría observarse en las profundidades del cuerpo. Estas “células iPS enfermas” se han denominado “pacientes en una placa de Petri”. La relevancia clínica de estas células se puede ilustrar mediante un ejemplo. Las células iPS derivadas de pacientes con un trastorno cardiaco llamado síndrome de QT largo se diferencian en células de músculo cardiaco que exhiben contracciones irregulares (“latidos”) en cultivo. Este fenotipo específico de enfermedad visto en cultivo puede corregirse con varios medicamentos que, por lo general, se prescriben para tratar este trastorno. Además, cuando estos cardiomiocitos que se habían diferenciado de las células iPS enfermas estaban expuestos al fármaco cisaprida, la irregularidad de sus contracciones aumentaba. La cisaprida es un medicamento que se usó para tratar la acidez estomacal, antes de que fuera retirado del mercado en Estados Unidos, una vez que se demostró que causaba arritmias cardiacas en ciertos pacientes. Los resultados de este tipo sugieren que las células diferenciadas derivadas de células iPS enfermas servirán como objetivos valiosos para el cribado de fármacos potenciales, por su eficacia para detener la progresión de la enfermedad.

A diferencia de las células ES, la generación de células iPS no requiere el uso de un embrión. Esta característica elimina todas las reservas éticas que acompañan al trabajo con células ES y también hace que sea mucho más fácil generar estas células en el laboratorio. Sin embargo, a medida que la investigación sobre las células iPS ha aumentado, sus posibilidades terapéuticas se han vuelto menos claras. Durante los primeros años de estudio, se pensó que las células iPS y las células ES eran, en esencia, indistinguibles. Estudios recientes, sin embargo, han demostrado que las células iPS carecen de la “alta calidad” característica de las células ES, y que no todas las células iPS son iguales. Por ejemplo, las células iPS ostentan ciertas anormalidades genómicas que no están presentes en las células ES, incluida la existencia de mutaciones y copias adicionales de segmentos aleatorios del genoma. Además, la cromatina que contiene DNA de las células iPS conserva ciertos rastros de las células originales a partir de las cuales se derivaron, lo que significa que no

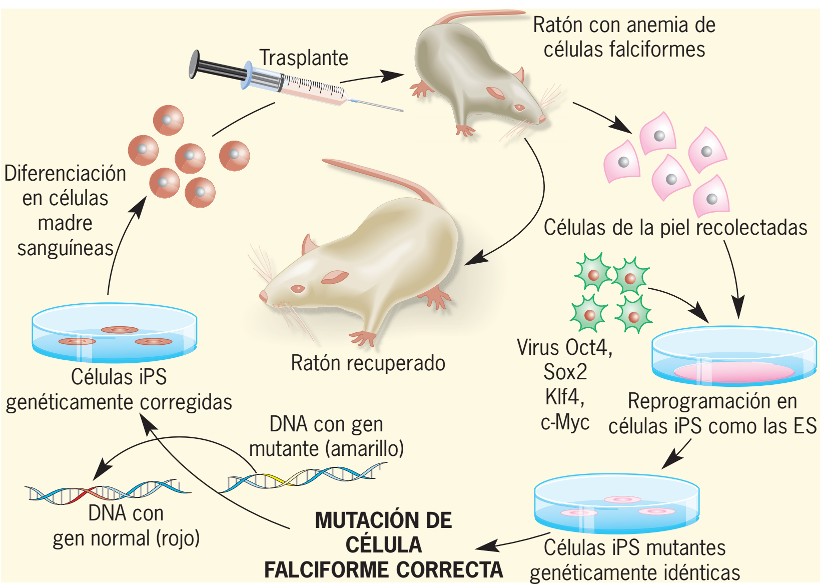



**FIGURA 3 Pasos seguidos para generar células madre pluripotentes inducidas (iPS), para su uso en la corrección de la anemia de células falciformes hereditaria en ratones.** Se recogen células de la piel del animal enfermo, se reprograman en cultivo introduciendo los cuatro genes necesarios, que se transportan a las células mediante virus y se dejan desarrollar en células iPS pluripotentes indiferenciadas. Las células iPS se tratan entonces para reemplazar el gen defectuoso (globina) con una copia normal, y las células iPS corregidas se hacen diferenciar en células madre sanguíneas normales en cultivo. Estas células madre sanguíneas se inyectan de nuevo en el ratón enfermo, donde proliferan y se diferencian en células sanguíneas normales, lo que cura el trastorno.

FUENTE: Reimpresa de una ilustración por Rudolf Jaenisch, *Cell* 2008;132:5, con permiso de Elsevier.

se reprograman completamente en células pluripotentes como las ES. Esta memoria residual de su origen hace que sea más fácil dirigir las células iPS hacia la diferenciación de vuelta a las células de las que se derivaron, que a otros tipos de células. Puede ser que estas aparentes deficiencias en las células iPS no sean un impedimento grave en su uso para tratar enfermedades que afectan a los tejidos adultos, pero ha planteado preguntas importantes. También hay otras discrepancias con las células iPS. Será importante desarrollar técnicas eficientes de reprogramación celular que no usen virus integradores del genoma, ya que tales células tienen el potencial de convertirse en cánceres. Se ha avanzado en este sentido, pero la eficacia de la formación de células iPS generalmente disminuye cuando se utilizan otros procedimientos para introducir genes.

Al igual que las células ES, las células iPS indiferenciadas también dan lugar a teratomas, por lo que es esencial que solo las células diferenciadas por completo se trasplanten en sujetos humanos. También como las células ES, las células iPS en uso actual tienen los mismos antígenos tisulares que los donantes que originalmente las proporcionaron, por lo que estimularían un ataque inmune si fueran trasplantadas a otros receptores humanos. Sin embargo, a diferencia de la formación de células ES, será mucho más fácil generar células iPS personalizadas compatibles con los tejidos, ya que pueden derivarse de una simple biopsia cutánea de cada paciente. Aún así, toma mucho tiempo, gastos y experiencia técnica para generar una población de células iPS de un donante específico. En consecuencia, si las células iPS alguna vez se desarrollan para un uso terapéutico generalizado, es probable que procedan de un gran banco de células que podría proporcionar células con compatibilidad hística suficiente para la mayoría de los receptores potenciales. También es posible eliminar todos los genes de las células iPS que normalmente evitan que estas se trasplanten a receptores aleatorios.

### Reprogramación de células directas

En 2008, el campo de la reprogramación celular dio otro giro inesperado con el anuncio de que un tipo de célula diferenciada se había convertido, directamente, en otro tipo de célula diferenciada, un caso de “transdiferenciación”. En este informe, las células acinares del páncreas, que producen enzimas responsables de la digestión de los alimentos en el intestino, se transformaron en células betapancreáticas, que sintetizan y secretan la hormona insulina. El proceso de reprogramación se produjo de manera directa, en cuestión de unos pocos días, sin que las células pasaran por un estado intermedio de células madre, y esto se produjo mientras las células permanecían en su residencia normal, dentro del páncreas de un ratón vivo. Esta hazaña se logró mediante la inyección, en los animales, de virus que portaban tres genes, los cuales se sabe que son importantes en la diferenciación de las células beta en el embrión. En este caso, los destinatarios de la inyección fueron ratones diabéticos, y la transdiferenciación de un número significativo de células acinares en células beta permitió a los animales regular sus niveles de azúcar en sangre con dosis de insulina mucho más bajas. También es digno de mención que los adenovirus utilizados para administrar los genes en este experimento no se vuelven parte permanente de la célula receptora, lo que elimina algunas de las preocupaciones sobre el uso de virus como portadores de genes en humanos. Desde este informe inicial, varios laboratorios han desarrollado técnicas *in vitro* para convertir directamente un tipo de célula diferenciada (por lo común, un fibroblasto) en otro tipo de célula, como una neurona, un cardiomiocito o un precursor de células sanguíneas, en cultivo, sin pasar por un intermediario pluripotente. En todos estos casos, la transdiferenciación ocurre cuando las células originales se ven obligadas a expresar ciertos genes que desempeñan un papel en la diferenciación embrionaria normal del otro tipo de célula. Es demasiado pronto para saber si este tipo de estrategia de reprogramación directa tiene potencial terapéutico, pero ciertamente plantea la posibilidad de que las células enfermas que necesitan ser reemplazadas se puedan formar de forma directa de otros tipos de células dentro del mismo órgano.

## Referencia

1. El trasplante de médula ósea puede contrastarse con una simple transfusión de sangre, en la que el receptor recibe células sanguíneas diferenciadas (en especial glóbulos rojos y plaquetas) presentes en la circulación.

## 1.7 Tamaños de las células y sus componentes

La **FIGURA 1-19** muestra el tamaño relativo de varias estructuras de interés en la biología celular. Dos unidades de medida lineal se usan con mayor frecuencia para describir estructuras dentro de una célula: el **micrómetro** (μm) y el **nanómetro** (nm). Un μm es igual a $10^{-6}$ metros, y un nm es igual a $10^{-9}$ metros. El **angstrom** (Å), que es igual a una décima de nm, es por lo general empleado por los biólogos moleculares para las dimensiones atómicas. Un angstrom es, más o menos, equivalente al diámetro de un átomo de hidrógeno. Las moléculas biológicas grandes (es decir, las macromoléculas) se describen en angstroms o nanómetros. La mioglobina, una proteína globular típica, es aproximadamente 4.5 nm $\times$ 3.5 nm $\times$ 2.5 nm; las proteínas altamente alargadas (como el colágeno o la miosina) tienen más de 100 nm de longitud, y el DNA tiene alrededor de 2.0 nm de ancho. Los complejos de macromoléculas, como los ribosomas, los microtúbulos y los microfilamentos, tienen un diámetro de entre 5 y 25 nm. A pesar de sus diminutas dimensiones, estos complejos macromoleculares constituyen “nanomáquinas” notablemente sofisticadas capaces de realizar una gran variedad de actividades mecánicas, químicas y eléctricas.

Las células y sus organelos se definen con más facilidad en micrómetros. Los núcleos, por ejemplo, tienen aproximadamente 5-10 μm de diámetro y las mitocondrias, alrededor de 2 μm de longitud. Es normal que las células procariotas varíen en longitud de aproximadamente 1 a 5 μm, y las células eucariotas cerca de 10 a 30 μm. Hay una serie de razones por las que la mayoría de las células son tan pequeñas. Considere lo siguiente.

- La mayoría de las células eucariotas poseen un núcleo único que contiene solo dos copias de la mayoría de los genes. Debido a que los genes sirven como plantillas para la producción de RNA mensajeros transportadores de información, una célula puede producir únicamente un número limitado de estos RNA mensajeros en una cantidad de tiempo dada. Cuanto mayor sea el volumen citoplásmico de una célula, más tiempo llevará sintetizar la cantidad de mensajes requeridos por esa célula.
- A medida que una célula aumenta de tamaño, la relación superficie/volumen disminuye.[3] La capacidad de una célula para intercambiar sustancias con su entorno es proporcional a su área de superficie. Si una célula creciera más allá de un cierto tamaño, su superficie no sería suficiente para absorber las sustancias (p. ej., oxígeno, nutrientes) necesarias para sus actividades metabólicas. Las células que están especializadas en la absorción de solutos, como las del epitelio intestinal, generalmente poseen microvellosidades que aumentan en

[3] Se puede comprobar esta afirmación calculando el área de la superficie y el volumen de un cubo cuya arista mida 1 cm, contra un cubo cuya arista mida 10 cm. La proporción área de superficie/volumen del cubo más pequeño será considerablemente mayor que la del cubo más grande.

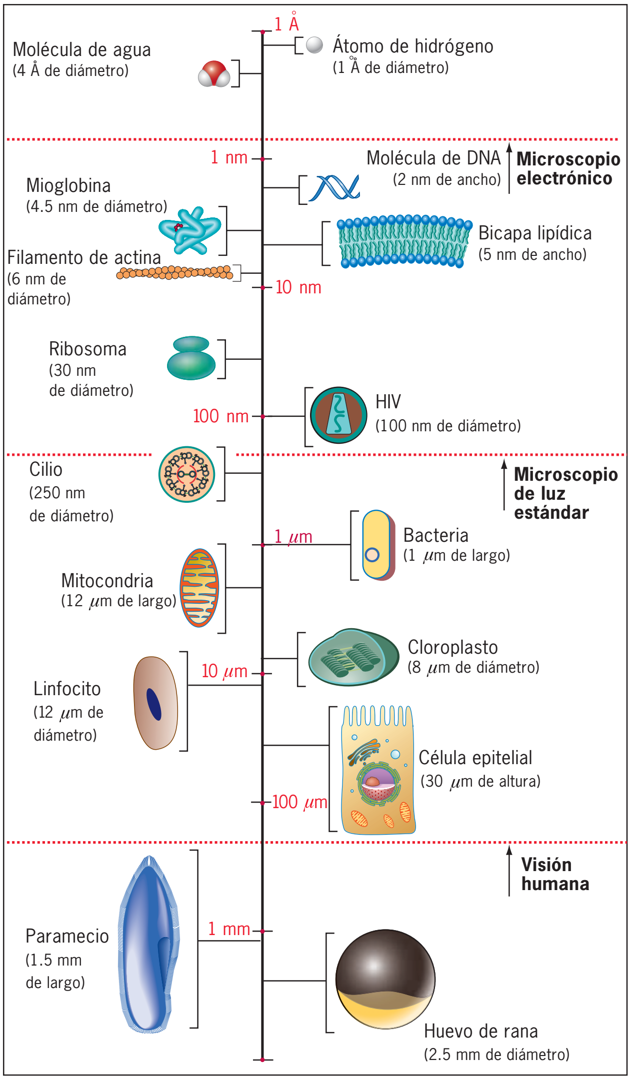



**FIGURA 1-19 Tamaños relativos de las células y sus componentes.** Estas estructuras difieren en tamaño en más de siete órdenes de magnitud.

gran medida el área de superficie disponible para el intercambio (véase figura 1-3). El interior de una célula vegetal grande por lo común se llena con una vacuola grande llena de fluido, en lugar de con un citoplasma metabólicamente activo (véase figura 8-36*b*).

- Una célula depende en gran medida del movimiento aleatorio de las moléculas (*difusión*). El oxígeno, por ejemplo, debe difundirse desde la superficie de la célula, a través del citoplasma, hasta el interior de su mitocondria. El tiempo requerido para la difusión es proporcional al cuadrado de la distancia a atravesar. Por ejemplo, el $O_2$ requiere solo 100 microsegundos para difundir una distancia de 1 μm, pero requiere $10^6$ veces más tiempo para difundir una distancia de 1 μm. A medida que una célula se hace más grande y la distancia desde la superficie al interior se hace mayor, el tiempo requerido para que la difusión mueva las sustancias dentro y fuera de una célula metabólicamente activa se hace larga de un modo prohibitivo.

Pero a pesar de estas limitaciones, algunas células eucariotas pueden ser extremadamente grandes. El organismo unicelular de forma libre *Stentor coeruleus*, que vive en estanques de agua dulce, crece hasta más de un milímetro de largo, y el alga verde gigante unicelular *Acetabularia* mide más de 10 cm de largo. El alga verde gigantesca unicelular *Caulerpa* puede crecer hasta una longitud de varios metros y contiene millones de núcleos en un citoplasma común. Sin embargo, los ejemplos de células de gran tamaño no están restringidos a tales organismos extraños. De hecho, tenemos algunos ejemplos en nuestros propios cuerpos. Las neuronas poseen protuberancias notablemente largas; las neuronas motoras en la médula espinal humana, por ejemplo, proyectan axones que pueden medir un metro de largo.




**FIGURA 1-20 ¿El juego de herramientas del biólogo sintético del futuro?** Este kit de herramientas es probable que contenga ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y muchos otros tipos de biomoléculas.

FUENTE: Cortesía de Jakob C. Schweizer.

El hecho de que las células sean colecciones de nanomáquinas ha inspirado un campo de investigación conocido como *biología sintética*, cuyo objetivo final es crear en el laboratorio un tipo mínimo de célula viva, a partir de los mismos tipos de componentes que se encuentran en la célula real. La biología sintética usa las moléculas, los complejos moleculares y los organelos de una célula como bloques de construcción, símil que se sugiere en la caricatura de la figura 1-20. Una de las motivaciones de estos investigadores es simplemente lograr la hazaña y, en el proceso, demostrar que la vida a nivel celular emerge de manera espontánea cuando los constituyentes apropiados se juntan a partir de materiales químicamente sintetizados. En este momento los biólogos solo han comenzado los primeros pasos en esta dirección. Tal trabajo tiene el potencial de iluminar los posibles orígenes de la vida y lanzar un enfoque nuevo en su totalidad a la biotecnología. Sin embargo, crear vida puede suscitar interesantes cuestiones morales e incluso religiosas. Un objetivo más modesto de la biología sintética es desarrollar nuevas formas de vida, utilizando como punto de partida organismos existentes, que tienen un valor único en la medicina y la industria, o en la limpieza del medio ambiente.

Si, como la mayoría de los biólogos argumenta, las propiedades y actividades de una célula surgen del diseño genético de esa célula, entonces debería ser posible crear un nuevo tipo de célula mediante la introducción de un nuevo modelo genético en el citoplasma de una célula existente. Esta hazaña fue lograda por J. Craig Venter y sus colegas en 2007, cuando reemplazaron el genoma de una bacteria con un genoma aislado de una especie estrechamente relacionada, transformando de modo efectivo una especie en la otra. En 2010, después de superar una serie de obstáculos técnicos obstinados, el equipo pudo lograr una hazaña similar, utilizando una copia de un genoma bacteriano que se había ensamblado (dentro de una célula de levadura) a partir de fragmentos de DNA que se habían sintetizado químicamente en el laboratorio. La copia sintética del genoma del donante, que ascendió a alrededor de 1.1 millones de pares de bases de DNA, contenía una serie de modificaciones introducidas por los investigadores. La copia modificada del genoma (de *M. mycoides*) se trasplantó a una célula de una especie bacteriana relacionada de manera estrecha (*M. capricolum*), donde reemplazó el genoma ori-

ginal del huésped. Después del trasplante de genoma, la célula receptora adquirió con rapidez las características de la especie de la que había sido derivado el DNA del donante. En efecto, estos investigadores han producido células que contienen un "esqueleto genético" al que pueden agregar combinaciones de nuevos genes tomados de otros organismos.

Investigadores de todo el mundo están intentando manipular organismos desde el punto de vista genético, para que posean vías metabólicas capaces de producir productos farmacéuticos, moléculas de combustible basadas en hidrocarburos y otros productos químicos útiles, a partir de precursores baratos y simples. Varias compañías están cultivando cianobacterias genéticamente modificadas, capaces de producir combustible diesel a partir de la luz solar, el agua y el $CO_2$. Investigadores de otra compañía haciendo uso de la genética han diseñado la bacteria común de laboratorio *E. coli,* para fermentar los complejos polisacáridos presentes en algas marinas del biocombustible etanol. Esta hazaña requirió la introducción en la *E. coli* de una combinación de genes derivados de otras tres especies bacterianas. También se ha comenzado a trabajar en la "reescritura" del genoma de la levadura, lo que significa que las células eucariotas se han convertido, además, en parte del esfuerzo por diseñar plantas de fabricación biológica modificadas genéticamente.

En principio, el trabajo descrito en "Perspectiva humana", en el que un tipo de célula se dirige a la formación de otro tipo de célula por completo diferente, es también una forma de biología sintética. Como resultado de estos muchos desvelos, los biólogos ya no se limitan a estudiar las células que están disponibles en la naturaleza, sino que dirigen igualmente su atención a las células que pueden estar disponibles a través de la manipulación experimental.

**REPASO**

1. ¿Por qué las células son casi siempre microscópicas?
2. Si una mitocondria tuviera 2 µm de longitud, ¿a cuántos angstroms equivaldría dicha longitud? ¿A cuántos nanómetros? ¿A cuántos milímetros?

## 1.8 Virus y viroides

Hacia finales del siglo XIX, el trabajo de Louis Pasteur y otros había convencido al mundo científico de que las enfermedades infecciosas de plantas y animales se debían a las bacterias. Pero los estudios de la enfermedad del mosaico del tabaco en las plantas de tabaco y de la fiebre aftosa del ganado señalaron la existencia de otro tipo de agente infeccioso. Se encontró, por ejemplo, que la savia de una planta enferma de tabaco podía transmitir la enfermedad del mosaico a una planta sana, incluso cuando la savia no mostrara evidencia de bacterias en el microscopio óptico. Para obtener más información sobre el tamaño y la naturaleza del agente infeccioso, Dmitri Ivanovsky, un biólogo ruso, hizo pasar la savia de una planta enferma a través de filtros cuyos poros eran tan pequeños que retrasaban el paso de la bacteria más pequeña conocida. El filtrado todavía era infectivo, lo que provocó que Ivanovsky concluyera en 1892, que ciertas enfermedades eran causadas por patógenos aún más pequeños y, presumiblemente, más simples que las bacterias más pequeñas conocidas. Estos patógenos se conocen como **virus**.

En 1935, Wendell Stanley, del Instituto Rockefeller, informó que el virus responsable de la enfermedad del mosaico del tabaco podía ser cristalizado y que los cristales eran infecciosos. Las sustancias que forman cristales tienen una estructura muy ordenada, bien definida y son mucho menos complejas que las células más simples. Stanley llegó a la conclusión errónea de que el virus del mosaico del tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*) era una proteína. De hecho, el TMV es una partícula en forma alargada que consiste en una sola molécula de RNA rodeada por una capa helicoidal compuesta de subunidades proteicas (**FIGURA 1-21**).

Los virus son responsables de docenas de enfermedades humanas, como el sida, la polio, la gripe, el ébola, el sarampión y algunos tipos de cáncer. Los virus se presentan en una amplia variedad de formas, tamaños y construcciones muy diferentes, pero todos comparten ciertas propiedades comunes. Todos los virus son parásitos intracelulares obligatorios; es decir, no pueden reproducirse a menos que estén presentes dentro de una célula anfitriona. Dependiendo del virus específico, el huésped puede ser una planta, un animal o una célula bacteriana. Al lado de una célula viva, el virus existe como una partícula, o virión, que es poco más que un paquete macromolecular. El virión contiene una pequeña cantidad de material genético que, en dependencia del virus, puede ser de cadena simple o doble, RNA o DNA. Curiosamente, algunos virus tienen tan solo tres o cuatro genes diferentes, pero otros pueden tener hasta varios cientos. El material genético del virión está rodeado por una cubierta proteica o cápside. Los viriones son agregados macromoleculares, partículas inanimadas que, por sí mismas, no pueden reproducirse, metabolizarse o llevar a cabo ninguna de las otras actividades asociadas con la vida. Por esta razón, los virus no se consideran organismos y no se describen como vivos.

En general, las cápsides virales se componen de un número específico de subunidades. La construcción por subunidades presenta numerosas ventajas, una de las más evidentes es la economía de la información genética. Si una capa viral está hecha de muchas copias de una sola proteína, como lo está la del TMV o la de algunas proteínas, al igual que las cubiertas de muchos otros virus, el virus necesita un solo gen, o unos pocos genes, para codificar su contenedor de proteínas. Muchos virus tienen una cápside cuyas subunidades están organizadas en un poliedro, es decir, una estructura que tiene caras planas. Una forma poliédrica particularmente común en los virus es el *icosaedro*, con 20 caras. Por ejemplo, el adenovirus, que causa infecciones respiratorias en

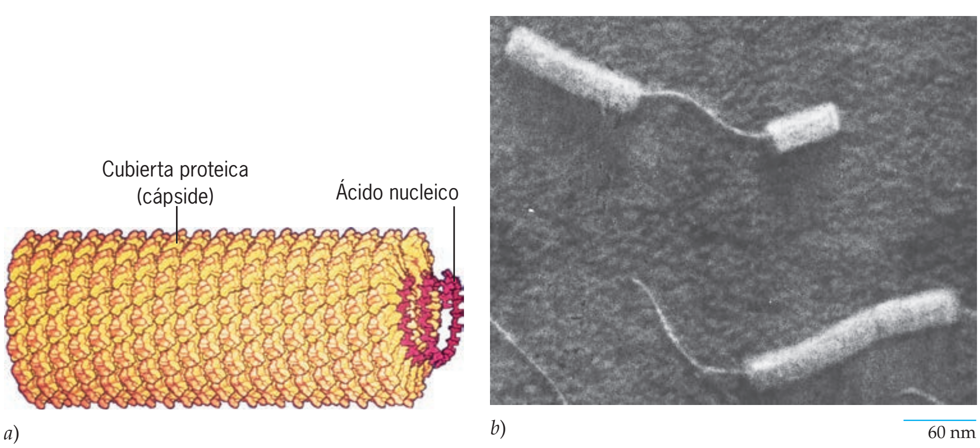



**FIGURA 1-21 Virus del mosaico del tabaco (TMV).** *a*) Modelo de una porción de una partícula del TMV. Las subunidades de proteínas, que son idénticas a lo largo de toda la partícula en forma de barra, encierran una sola molécula de RNA helicoidal (roja). *b*) Micrografía electrónica de partículas del TMV, después de que el fenol ha eliminado las subunidades de proteína de la parte media de la partícula superior y los extremos de la partícula inferior. Las varillas intactas tienen aproximadamente 300 nm de largo y 18 nm de diámetro.
FUENTE: *a*) Cortesía de Gerald Stubbs, Keuchi Namba y Donald Caspar; *b*) cortesía de M. K. Corbett.

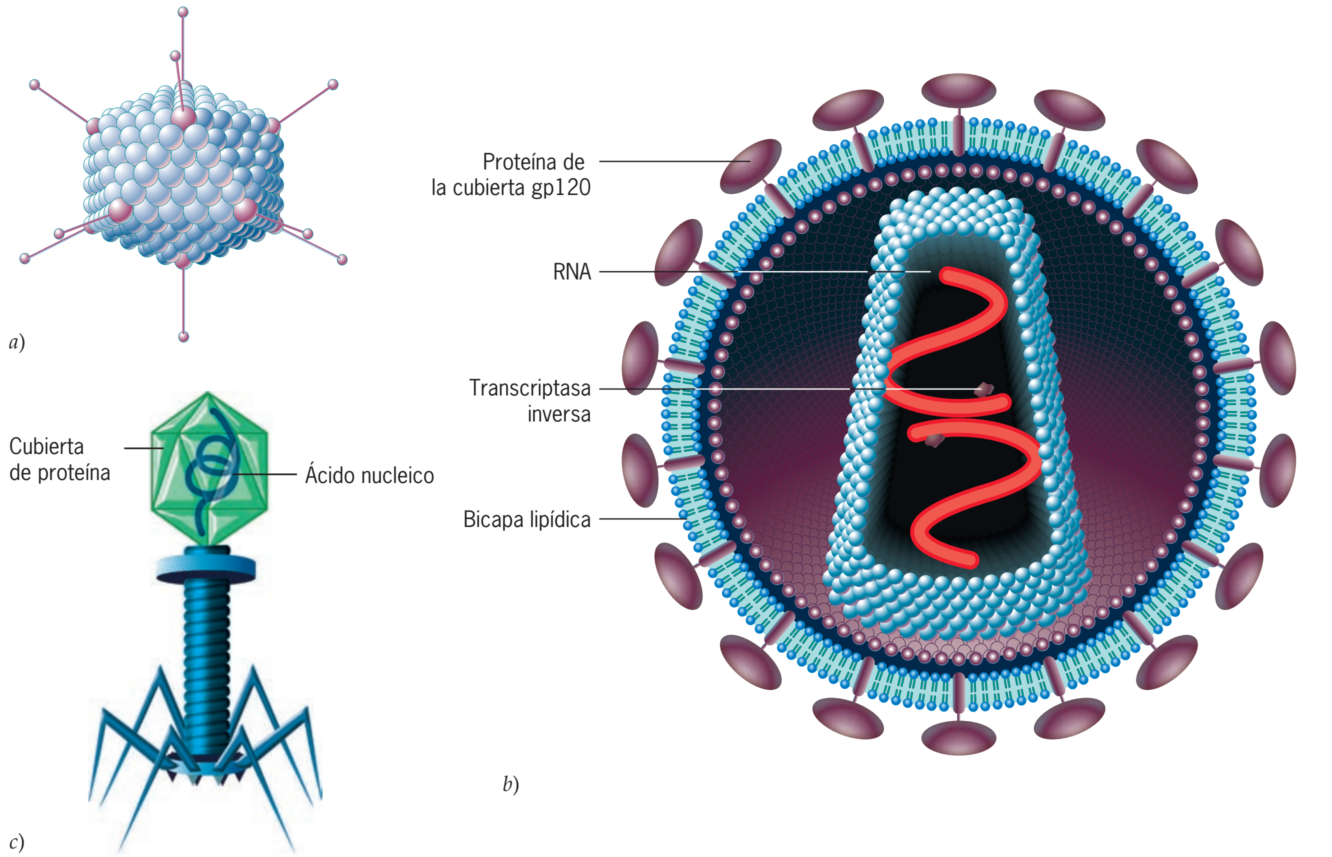



**FIGURA 1-22 Diversidad viral.** Las estructuras de *a*) un adenovirus, *b*) un virus de inmunodeficiencia humana (sida) y *c*) un bacteriófago T. *Nota:* Estos virus no están dibujados en la misma escala.

los mamíferos, tiene una cápside icosahédrica (**FIGURA 1-22*a***). En muchos virus animales, incluido el *virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH, *human immunodeficiency virus*) responsable del sida, la cápside proteica está rodeada por una envoltura fosfolipídica externa que proviene de la membrana plasmática modificada de la célula hospedadora, obtenida cuando el virus salió por gemación de la superficie celular (figura 1-22*b*). Los virus bacterianos, o *bacteriófagos*, se encuentran entre los virus más complejos (figura 1-22*c*). También son las entidades biológicas más abundantes en la Tierra. Los bacteriófagos T (que se utilizaron en experimentos clave que revelaron la estructura y propiedades del material genético) consisten en una cabeza poliédrica que contiene DNA, un tallo cilíndrico a través del cual se inyecta el DNA en la célula bacteriana, y fibras de la cola, partes que en su conjunto forman una partícula parecida a un módulo de aterrizaje lunar.

Cada virus tiene en su superficie una proteína que es capaz de unirse a un componente superficial particular de su célula huésped. Por ejemplo, la proteína que se proyecta desde la superficie de la partícula del VHI (etiquetada en la figura 1-22*b* como gp120, que significa glicoproteína de masa molecular 120 000 daltons)[4] interactúa con una proteína específica (llamada CD4) en la superficie de ciertos glóbulos blancos, facilitando la entrada del virus en su célula huésped. La interacción entre las proteínas virales y las proteínas del huésped determina la especificidad del virus, es decir, los tipos de células del huésped que el virus puede ingresar e infectar. Algunos virus tienen un amplio rango de huéspedes, pudiendo infectar células de una variedad de diferentes órganos o especies hospederas. El virus que causa la rabia, por citar uno, puede infectar a muchos tipos diferentes de huéspedes mamíferos, incluidos perros, murciélagos y humanos. La mayoría de los virus, sin embargo, tienen un rango de huéspedes relativamente estrecho. Esto se cumple, por ejemplo, para los virus del resfriado y la gripe humanos, que por lo común son capaces de infectar solo las células epiteliales respiratorias de los huéspedes humanos.

Un cambio en la especificidad de la célula huésped puede tener consecuencias sorprendentes. Este punto se ilustra de forma dramática con la pandemia de influenza de 1918, que mató a más de 30 millones de personas en todo el mundo. El virus fue sobre todo letal en adultos jóvenes, que normalmente no son víctimas de la influenza. De hecho, las 675 000 muertes causadas por este virus en Estados Unidos redujeron la esperanza de vida promedio durante varios años. En una de las hazañas más aclamadas —y controvertidas— de los últimos tiempos, los investigadores han podido determinar la secuencia genómica del virus responsable de esta pandemia y reconstituir el virus en su estado completamente virulento. Esto se logró aislando los genes virales (que son parte de un genoma que consiste en ocho moléculas de RNA separadas que codifican 11 proteínas diferentes) de los tejidos conservados de las víctimas que habían muerto por dicha infección 90 años antes. Las muestras mejor conservadas se obtuvieron de una mujer indígena que había sido enterrada en el *permafrost* de Alaska. La secuencia del "virus de 1918" sugirió que el patógeno había saltado de las aves a los humanos. Aunque el virus había acumulado un número considerable de mutaciones que lo adaptaban a un huésped mamífero, nunca había intercambiado material genético con el de un virus de influenza humana como se había pensado.

El análisis de la secuencia del virus de 1918 ha proporcionado algunas pistas para explicar por qué era tan mortal y cómo se propagó con tanta eficacia de un ser humano a otro. Utilizando la secuencia genómica, los investigadores reconstituyeron el virus de 1918 en partículas infecciosas, que se mostraron excepcionalmente virulentas en pruebas de laboratorio. A pesar de que es normal que los ratones de laboratorio sobrevivan a la infección

[4] Un Dalton es equivalente a una unidad de masa atómica, la de un solo átomo de hidrógeno ($^{1}$H).

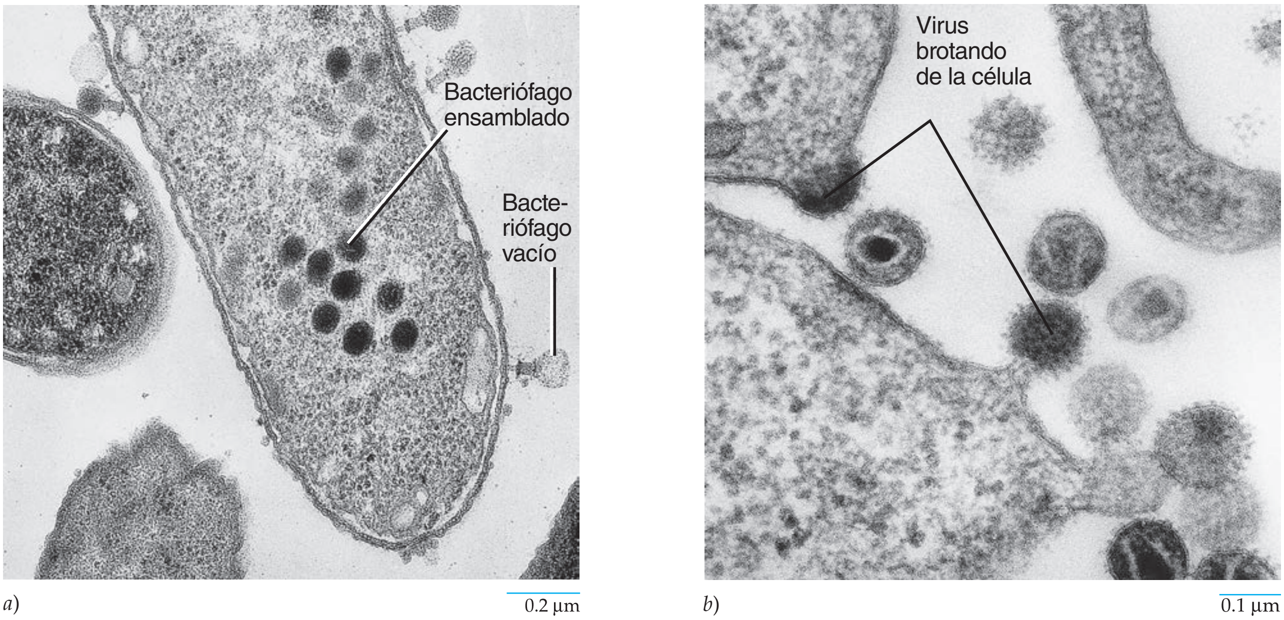



**FIGURA 1-23 Infección viral.** *a*) Micrografía que muestra una etapa tardía en la infección de una célula bacteriana por un bacteriófago. Las partículas de virus se están ensamblando dentro de la célula, y las cubiertas vacías del bacteriófago todavía están presentes en la superficie de la célula. *b*) Micrografía que muestra partículas de VIH que brotan de un linfocito humano infectado.

FUENTE: *a*) Cortesía de Jonathan King y Erika Hartwig; *b*) cortesía de Hans Gelderblom.

por los virus de la influenza humana modernos, la cepa de 1918 reconstituida mató a 100% de los ratones infectados y produjo una enorme cantidad de partículas virales en los pulmones de estos animales. Debido al riesgo potencial para la salud pública, la publicación de la secuencia completa del virus de 1918 y su reconstitución avanzó solo después de ser aprobados por los paneles de seguridad gubernamentales y de que se demostrara que las vacunas contra la influenza y los fármacos existentes protegían a los ratones del virus reconstituido.

Hay dos tipos básicos de infección viral. 1) En la mayoría de los casos, el virus detiene las actividades sintéticas normales del huésped y redirige a la célula para usar sus materiales disponibles en función de fabricar ácidos nucleicos virales y proteínas que se ensamblan en nuevos viriones. Los virus, en otras palabras, no crecen como células; se ensamblan directamente, a partir de componentes, en los viriones maduros. En última instancia, la célula infectada se rompe (*lisis*) y libera una nueva generación de partículas virales capaces de infectar a las células vecinas. Un ejemplo de este tipo de infección *lítica* se muestra en la **FIGURA 1-23*a***). 2) En otros casos, el virus infeccioso no conduce a la muerte de la célula huésped, sino que inserta (*integra*) su DNA en el DNA de los cromosomas de la célula huésped. El DNA viral integrado se llama **provirus**. Un provirus integrado puede tener diferentes efectos, según el tipo de virus y la célula huésped. Por ejemplo:

- Las células bacterianas que contienen un provirus se comportan de manera normal, hasta que se exponen a un estímulo, como la radiación ultravioleta, que activa el DNA vírico inactivo, lo que lleva a la lisis de la célula y a la liberación de la progenie viral.
- Algunas células animales que contienen un provirus producen una nueva progenie viral que brota en la superficie de la célula sin producir lisis de la célula infectada. El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) actúa de esta manera; una célula infectada puede permanecer viva durante un periodo, actuando como una fábrica para la producción de nuevos viriones (figura 1-23*b*).
- Algunas células animales que contienen un provirus pierden el control sobre su propio crecimiento y división, y se vuelven malignas. Este fenómeno se estudia fácilmente en el laboratorio, al infectar células cultivadas con el virus tumoral apropiado.

Los virus no carecen de virtudes. Debido a que las actividades de los genes virales imitan las de los genes del hospedero, los investigadores han usado virus durante décadas como una herramienta de investigación para estudiar el mecanismo de replicación del DNA y la expresión génica en hospedadores mucho más complejos. Además, los virus están siendo utilizados como un medio para introducir genes extraños en las células humanas, una técnica que probablemente servirá como base para el tratamiento de enfermedades humanas mediante la terapia génica. Por último, los virus que atacan a insectos y bacterias pueden desempeñar un papel cada vez más importante en la guerra contra las plagas de insectos y los patógenos bacterianos. Los bacteriófagos se han utilizado durante décadas para tratar las infecciones bacterianas en Europa oriental y Rusia, mientras que los médicos en Occidente han dependido de los antibióticos. Dado el aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos, los bacteriófagos pueden estar volviendo a los prometedores estudios en ratones infectados. Varias compañías de biotecnología están produciendo bacteriófagos destinados a combatir las infecciones bacterianas y proteger ciertos alimentos de este tipo de contaminación.

Fue una sorpresa en 1971 descubrir que los virus no son los tipos más simples de agentes infecciosos. En ese año, T. O. Diener, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, informó que la enfermedad de la deformación fusiforme del tubérculo de la papa, que hace que estas se agrieten y formen nudos, es causada por un agente infeccioso que consiste en una pequeña molécula de RNA circular que carece totalmente de cubierta proteica. Diener llamó al patógeno un **viroide**. Los RNA de los viroides varían en tamaño desde unos 240 a 600 nucleótidos, una décima parte del tamaño de los virus más pequeños. No se ha encontrado evidencia de que el RNA del viroide desnudo codifique ninguna proteína. Por el contrario, cualquier actividad bioquímica en la que participen los viroides tiene lugar utilizando proteínas de la célula huésped. Por ejemplo, la duplicación del RNA del viroide dentro de una célula infectada utiliza la RNA polimerasa II del huésped, una enzima que normalmente transcribe el DNA del huésped en RNA mensajeros. Se cree que los

viroides causan enfermedades al interferir con la vía normal de expresión genética de la célula. Su efecto sobre los cultivos puede ser grave: una enfermedad por viroide llamada cadang-cadang ha devastado los cocotales de Filipinas, y otro viroide ha causado estragos en la industria del crisantemo en Estados Unidos. El descubrimiento de un tipo diferente de agente infeccioso, incluso más simple que un viroide, es descrito en "Perspectiva humana", en el capítulo 2.

**REPASO**

1. ¿Qué propiedades distinguen a un virus de una bacteria?
2. ¿Qué tipos de infecciones son capaces de causar los virus?
3. Compare y analice: nucleoide y núcleo; el flagelo de una bacteria y el de un espermatozoide; una arqueobacteria y una cianobacteria; la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis; bacteriófagos y el virus del mosaico del tabaco; un provirus y un virión.



# 1.9 VÍAS EXPERIMENTALES

## Origen de las células eucariotas

Hemos visto en este capítulo que las células se pueden dividir en dos grupos: células procariotas y células eucariotas. Casi desde el momento en que se propuso esta división de la vida celular, los biólogos se han sentido fascinados por la siguiente pregunta: ¿cuál es el origen de la célula eucariota? En general, se acepta que las células procariotas 1) surgieron antes que las células eucariotas y 2) dieron lugar a las células eucariotas. El primer punto se puede verificar directamente a partir del registro fósil, que muestra que las células procariotas estuvieron presentes en rocas de cerca de 2 700 millones de años (página 8), que es alrededor de 1 000 millones de años antes de que se observe evidencia de eucariotas. El segundo punto se deriva del hecho de que los dos tipos de células deben relacionarse entre sí, porque comparten muchos rasgos complejos (p. ej., códigos genéticos, enzimas, vías metabólicas y membranas plasmáticas muy similares) que no podrían haber evolucionado de forma independiente en diferentes organismos.

Hasta cerca de 1970, por lo general se creía que las células eucariotas evolucionaban a partir de células procariotas, mediante un proceso de evolución gradual, en el que los organelos de la célula eucariota se volvían progresivamente más complejos. La aceptación de este concepto cambió de manera radical en esa época, debido en gran medida al trabajo de Lynn Margulis, en ese entonces en la Universidad de Boston. Margulis resucitó una idea que se había propuesto antes, y descartó que ciertos organelos de una célula eucariota, en especial las mitocondrias y los cloroplastos, hubieran evolucionado a partir de células procariotas más pequeñas, que habían establecido su residencia en el citoplasma de una célula huésped más grande.[1] Esta hipótesis se conoce como la **teoría endosimbiótica**, porque describe cómo una sola célula "compuesta" de mayor complejidad podría evolucionar a partir de dos o más células separadas, y más simples, que viven en una relación simbiótica entre sí.

Se suponía que nuestros primeros antepasados procarióticos eran células heterotróficas anaeróbicas: *anaeróbico* significa que derivan su energía de la materia alimenticia sin emplear oxígeno molecular ($O_2$), y *heterotrófico* significa que no son capaces de sintetizar compuestos orgánicos a partir de precursores inorgánicos (como $CO_2$ y agua), pero, en cambio, obtienen de su entorno compuestos orgánicos preformados. Se cree que estos antepasados procarióticos adquirieron la capacidad de formar compartimentos internos de membrana, lo que permitió la formación de un núcleo, al contener el DNA dentro de una membrana interna. Este desarrollo de membranas internas produjo el primer organismo que se consideraría eucariota en términos de tener un núcleo u otros compartimentos internos (**FIGURA 1**). Debido

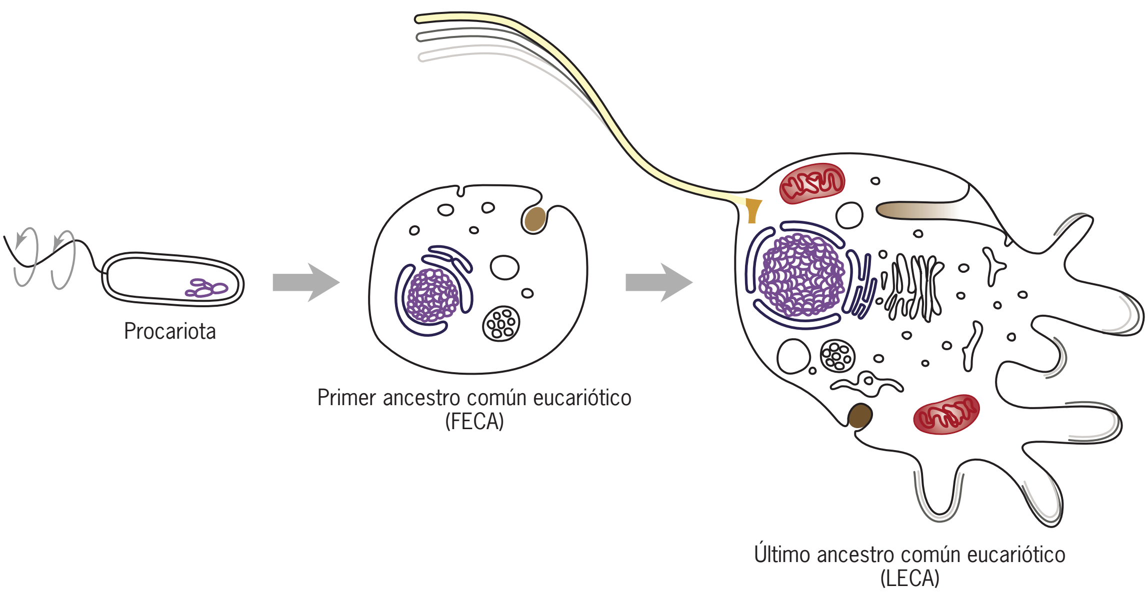



**FIGURA 1 Un modelo que representa etapas en la evolución de eucariotas.** A partir de un antepasado procariótico, los compartimentos internos comenzaron a desarrollarse, dando lugar a un organismo con compartimentos de membrana interna, como un núcleo. Tal organismo se conoce como el Primer Ancestro Común Eucariótico (FECA). La maquinaria molecular para fabricar membranas internas permitió que el FECA absorbiera y mantuviera organismos endosimbióticos, lo que permitió la adquisición de mitocondrias. Las innovaciones evolutivas adicionales dieron lugar a características celulares comunes a todos los linajes eucarióticos, incluidos los cilios, la unión o inserción de intrones y la meiosis. El organismo que tenía todos estos rasgos, y por consiguiente dio origen a todos los linajes eucarióticos existentes, se conoce como el Último Ancestro Común Eucariótico (LECA). Después de que surgió el LECA, otros pasos evolutivos, como la endosimbiosis de las bacterias fotosintéticas para producir cloroplastos, dieron lugar a diferentes clases de células eucariotas.

FUENTE: Tomada de F. D. Mast, *et al*. *Trends Cell Biol* 2014;24:435-442.

a que este es el primer organismo que después dio origen a todos los eucariotas, se le conoce como el primer ancestro común eucariótico (FECA, *first eukaryotic common ancester*). Aunque la presencia de membranas internas una vez fue, sin embargo, un rasgo exclusivamente eucariótico, ahora se sabe que algunas bacterias pueden, de hecho, formar extensos sistemas complejos de membrana interna. El ejemplo más elocuente conocido hasta la fecha es la bacteria *Gemmata obscuriglobus*, que forma una variedad de membranas internas complejas (**FIGURA 2**). Sin embargo, reconstrucciones tridimensionales cuidadosas de la estructura de *G. obscuriglobus* muestran que estas membranas no forman compartimentos cerrados como los organelos eucarióticos.[2] Parece, por tanto, que el paso clave en la producción del FECA no fue la formación de membranas internas *per se*, sino el posterior desarrollo de estas membranas en compartimentos internos cerrados, en particular un compartimento que rodea al DNA para producir un núcleo.

De acuerdo con la teoría endosimbiótica, el siguiente paso en la evolución de los eucariotas modernos ocurrió cuando un descendiente de la célula FECA ingirió una pequeña procariota aeróbica que, de alguna manera, resistió la digestión dentro del citoplasma y se estableció como un endosimbionte permanente. Como la célula huésped se reprodujo, también lo hizo el endosimbionte, de modo que pronto se produjo una colonia de estas células compuestas. Durante muchas generaciones, los endosimbiontes perdieron varios de los rasgos que ya no eran necesarios para la supervivencia, y los microbios que alguna vez fueron respiradores independientes de oxígeno evolucionaron hasta convertirse en precursores de las mitocondrias modernas. Una célula cuyos antepasados se formaron a través de la secuencia de los eventos simbióticos que acabamos de describir podría haber dado lugar a una línea de células que desarrollaron otras características básicas de células eucariotas, incluidos organelos internos adicionales (retículo endoplasmático, complejo de Golgi, lisosomas), un citoesqueleto complejo que incluye cilios, unión o inserción de intrones y división celular mitótica y meiótica. Se ha propuesto que estas características, compartidas entre todos los linajes eucarióticos existentes, han surgido mediante un proceso gradual de evolución, en lugar de por un solo paso, como podría ocurrir a través de la adquisición de un endosimbionte. Todos los eucariotas vivos hoy descienden de la célula que adquirió estos rasgos, la cual se conoce como el último ancestro común eucariótico (LECA, *last eukaryotic common ancester*). La investigación actual sobre biología celular evolutiva se centra en la reconstrucción de las características moleculares, estructurales y funcionales del FECA y el LECA, al comparar las características de los linajes eucarióticos y procarióticos existentes. Los fósiles que se consideran más antiguos son restos de eucariotas que datan de hace unos 1 800 millones de años.

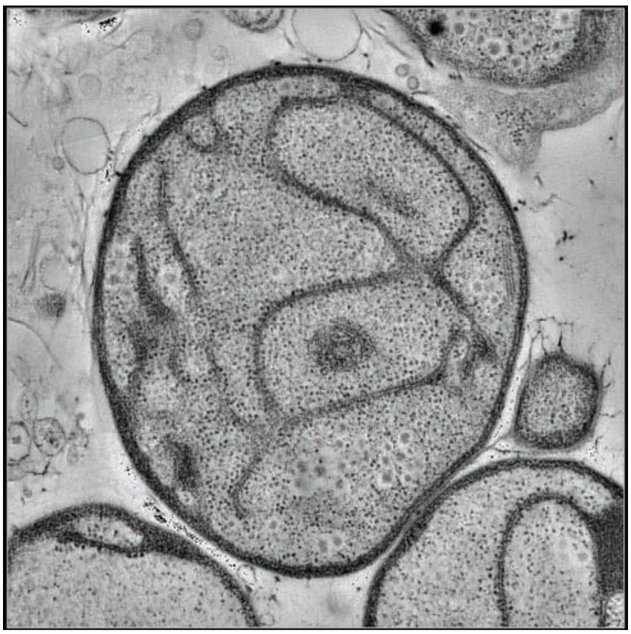


**FIGURA 2 Procariotas con sistemas complejos de membrana interna.** Micrografía electrónica de *Gemmata obscuriglobus*, una bacteria con un conjunto complejo de membranas internas. Aunque estas membranas no forman organelos cerrados, como lo harían en las eucariotas, muestran que existe un potencial para la organización de la membrana, incluso en procariotas.

FUENTE: Tomada de R. Santarella-Mellwig, *et al*. *Plos Biol* 2013;11:E1001565.

Margulis propuso que la adquisición de otro endosimbionte, en particular una cianobacteria, convirtió una eucariota heterotrófica antigua en un ancestro de eucariotas fotosintéticas: las algas verdes y las plantas.[3] La adquisición de los cloroplastos (hace aproximadamente 1 000 millones de años) debe haber sido uno de los últimos pasos en la secuencia de endosimbiosis, porque estos organelos solo están presentes en plantas y algas. En contraste, todos los grupos conocidos de eucariotas 1) poseen mitocondrias o 2) muestran evidencia definitiva de que han evolucionado a partir de organismos que poseían estos organelos.[a] El concepto de que las mitocondrias y los cloroplastos surgieron a través de la evolución de organismos simbióticos está respaldado en la actualidad por un abrumador conjunto de pruebas, algunas de las cuales se describirán en numerosos capítulos de este texto.

La división de todos los organismos vivos en dos categorías, procariotas y eucariotas, refleja una dicotomía básica en las estructuras de las células, pero no es necesariamente una distinción filogenética precisa, es decir, una que manifieste las relaciones evolutivas entre los organismos vivos. ¿Cómo se pueden determinar las relaciones evolutivas entre los organismos que se han separado en el tiempo durante miles de millones de años, como los procariotas y los eucariotas? Los esquemas taxonómicos modernos que intentan clasificar organismos se basan en comparaciones de las secuencias de DNA de organismos vivos.[4] Las diferencias entre organismos en la secuencia de nucleótidos que componen un ácido nucleico son el resultado de mutaciones en el DNA que se han transmitido a la descendencia. Las mutaciones pueden acumularse en un gen determinado a un ritmo relativamente constante durante largos periodos. En consecuencia, las comparaciones de secuencias de nucleótidos pueden usarse para determinar qué tan cerca están los organismos entre sí. Por ejemplo, dos organismos que están relacionados de manera estrecha, es decir, han divergido apenas recientemente de un ancestro común, deberían tener menos diferencias de secuencia en un gen particular, que dos organismos que están relacionados de forma lejana, es decir, que no tienen un ancestro común reciente. Utilizando este tipo de información de secuencia como un “reloj evolutivo”, los investigadores pueden construir árboles filogenéticos que muestren las vías propuestas, por las cuales diferentes grupos de organismos vivos pueden haber divergido unos de otros durante el curso de la evolución.

A mediados de la década de 1970, Carl Woese y sus colegas de la Universidad de Illinois comenzaron una serie de estudios que comparaban la secuencia de nucleótidos en diferentes organismos de la molécula de RNA que reside en la pequeña subunidad del ribosoma. Este RNA —que se llama rRNA 16S en

[a] Existen varias eucariotas unicelulares anaeróbicas (p. ej., el parásito intestinal *Giardia*) que carecen de mitocondrias. Durante años, estos organismos formaron la base de una propuesta de que la endosimbiosis mitocondrial era un evento tardío que tuvo lugar después de la evolución de estos grupos que carecen de mitocondrias. Sin embargo, el análisis reciente del DNA nuclear de estos organismos indica la presencia de genes que, es probable, se transfirieron al núcleo de las mitocondrias, lo que sugiere que sus antepasados perdieron sus mitocondrias durante el curso de la evolución.

(*continúa*)

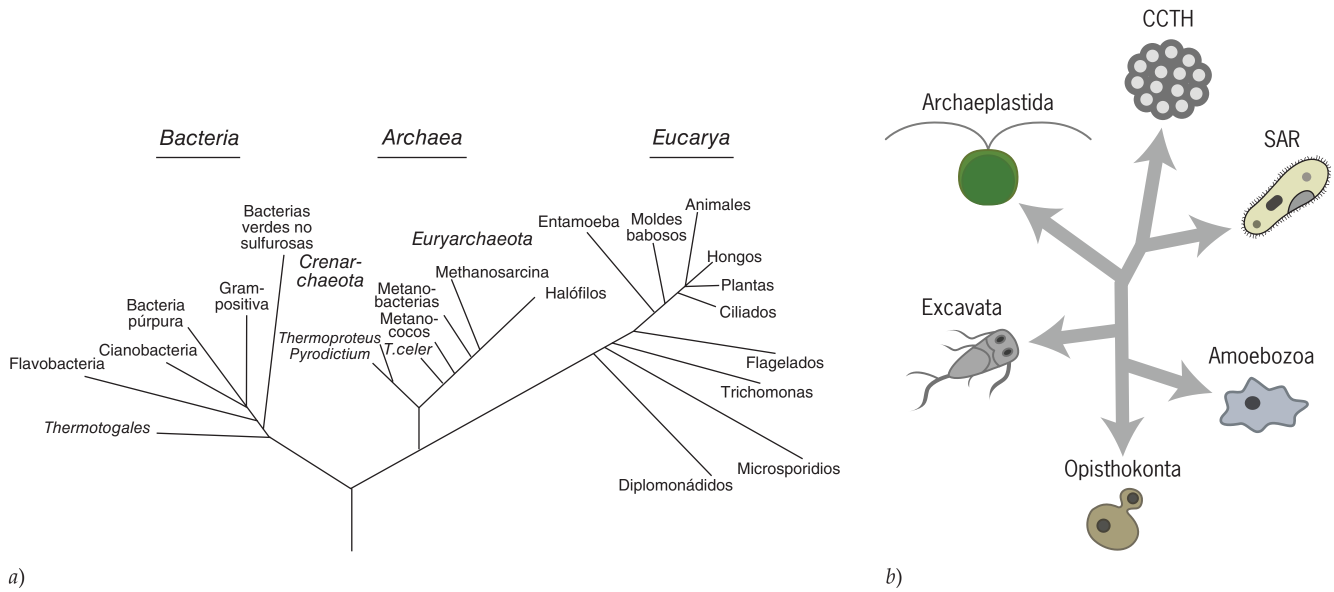



**FIGURA 3 Dominios de la vida.** *a*) Un árbol filogenético basado en comparaciones de secuencias de rRNA que muestra los tres dominios de la vida. Archaea se divide en dos subgrupos según se indica. *b*) Relación filogenética entre linajes eucariotas existentes. Aunque el análisis inicial de rRNA, como en el panel A, sugirió una serie de ramificaciones tempranas y tardías para producir diferentes linajes de eucariotas, un análisis más cuidadoso de genes y genomas propone actualmente que seis linajes principales divergieron del LECA para producir distintas clases de eucariotas conocidas como “supergrupos”. Los animales y los hongos, aunque se ven diferentes, son muy similares a nivel molecular, y juntos forman un solo grupo, *Opisthokonta*. Las plantas y las algas verdes, de nuevo con un aspecto diferente, están estrechamente relacionadas por la filogenia molecular y forman un grupo llamado Archaeplastida. Una amplia gama de otras eucariotas, incluidas muchas especies diferentes anteriormente agrupadas como “protistas”, ahora están claramente divididas en cuatro grupos distintos con nombres poco familiares: Excavata (que incluye los parásitos Giardia y Naegleria), *Amoebozoa*, SAR (que incluye ciliados como el Paramecium, así como diatomeas y algas marrones como las algas marinas gigantes) y CCTH (compuesto completamente por organismos unicelulares oscuros y desconocidos cuya biología es poco comprendida).

FUENTE: *a*) Tomada de C. R. Woese, *et al. Proc Nat'l Acad Sci USA* 1990;87:4578; *b*) tomada de F. D. Mast, *et al. Tends Cell Biol* 2014;24:435-442.

procariotas o rRNA 18S en eucariotas— se eligió porque está presente en grandes cantidades en todas las células, es fácil de purificar y tiende a cambiar solo lentamente durante largo tiempo evolutivo, lo que significa que podría usarse para estudiar analogías entre organismos relacionados de manera distante. En uno de sus primeros estudios, Woese y sus colegas analizaron el rRNA presente en los ribosomas de los cloroplastos del prototipo fotosintético *Euglena*.[5] Encontraron que la secuencia de esta molécula de rRNA de cloroplastos era mucho más similar a la del rRNA 16S que se encuentra en los ribosomas de las cianobacterias, que a su contraparte 18S en los ribosomas del citoplasma eucariótico. Este hallazgo proporcionó una fuerte evidencia del origen simbiótico de los cloroplastos de las cianobacterias.

En 1977, Woese y George Fox publicaron un documento histórico para el estudio de la evolución molecular.[6] Compararon las secuencias de nucleótidos de rRNA de subunidades pequeñas que se habían purificado, pertenecientes a 13 especies diferentes de procariotas y eucariotas. Descubrieron que las secuencias se asociaron en tres grupos distintos, de modo que los rRNA dentro de cada grupo eran mucho más similares entre sí de lo que eran con los rRNA de los otros dos grupos. El primero de los grupos contenía solo eucariotas; el segundo grupo contenía las bacterias “típicas” (grampositivas, gramnegativas y cianobacterias), y el tercer grupo contenía varias especies de “bacterias” metanogénicas (productoras de metano). Woese y Fox concluyeron, para su sorpresa, que los organismos metanogénicos “parecen no estar más relacionados con las bacterias típicas que con los citoplasmas eucarióticos”. Los resultados sugirieron que los miembros de estos tres grupos representaban tres líneas evolutivas distintas, que se ramificaron una de la otra en una etapa muy temprana de la evolución de los organismos celulares. En consecuencia, asignaron estos organismos a tres reinos diferentes, a los que denominaron Urcariota, Eubacteria y Archaebacteria, una terminología que dividió a los procariotas en dos grupos fundamentalmente distintos.

La investigación posterior proporcionó apoyo al concepto de que los procariotas podrían dividirse en dos linajes lejanos, y expandió los rangos de las arqueobacterias para incluir, al menos, a otros dos grupos, los termófilos, que viven en fuentes termales y respiraderos oceánicos, y los halófilos, que viven en lagos y mares muy salados. En 1989, dos informes publicados enraizaron el árbol de la vida y sugirieron que las arqueobacterias en realidad estaban más relacionadas con los eucariotas que con las eubacterias.[7,8] Ambos grupos de investigadores compararon las secuencias de aminoácidos de varias proteínas que estaban presentes en una amplia variedad de diferentes procariotas, eucariotas, mitocondrias y cloroplastos. En la **FIGURA 3*a*)** se muestra un árbol filogenético construido a partir de secuencias de RNA ribosomales, con el que se llega a la misma conclusión.[9] En este último documento, Woese y sus colegas propusieron un esquema taxonómico revisado que ha sido ampliamente aceptado. En este esquema, las arqueobacterias, las eubacterias y las eucariotas se asignan a dominios separados, que se denominan Archaea, Bacteria y Eucarya, respectivamente.[b] Estudios similares de análisis de secuencias de DNA han demostrado que las eucariotas se dividen en seis linajes distintos (**FIGURA 3*b***), de los cuales los animales, incluidos los humanos, pertenecen a un grupo conocido como “Opisthokonta”. Según el modelo de la figura 3*a*), la primera división importante en el árbol de la vida produjo dos linajes separados, uno que conduce al dominio Bacteria, y otro que conduce tanto a Archaea como a Eucarya. Si esta visión es correcta, fue una arqueobacteria, no una eubacteria, la que tomó un simbionte y dio origen al linaje que condujo a las primeras células eucariotas. Aunque el procariota huésped era presumiblemente una arqueobacteria, los simbiontes que evolu-

[b] Muchos biólogos desaprueban los términos arqueobacteria y eubacteria. Aunque estos términos han desparecido de manera gradual de la literatura, siendo reemplazados simplemente por archaea y bacteria, muchos investigadores de este campo continúan usando en sus artículos publicados los términos anteriores. Dado que este es un capítulo introductorio en un libro introductorio, continuaremos refiriéndonos a estos organismos como arqueobacterias y eubacterias, para evitar posibles confusiones sobre el significado del término bacteriano.

cionaron a mitocondrias y cloroplastos casi con seguridad fueron eubacterias, como lo indica su estrecha relación con los miembros modernos de este grupo.

Hasta 1995, los árboles filogenéticos del tipo que se muestra en la figura 3*a*) se basaron principalmente en el análisis del gen que codifica el rRNA 16S-18S. Para entonces, las comparaciones filogenéticas de varios otros genes sugerían que el esquema descrito en la figura 3*a*) podría ser demasiado simplificado. Las preguntas sobre el origen de las células procariotas y eucariotas se enfocaron con nitidez entre 1995 y 1997, cuando se publicaron las secuencias enteras de varios genomas procariotas, tanto arqueobacterianos como eubacterianos, y del genoma de una eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los investigadores ahora pueden comparar las secuencias de cientos de genes simultáneamente, y este análisis plantea una serie de preguntas desconcertantes y desdibuja las líneas de distinción entre los tres dominios.[10] Por ejemplo, los genomas de varias arqueobacterias mostraron la presencia de un número significativo de genes eubacteriales. En su mayor parte, aquellos genes en arqueobacterias, cuyos productos están involucrados en procesos informativos (estructura de los cromosomas, transcripción, traducción y replicación), eran muy diferentes de sus contrapartes en células eubacteriales y, de hecho, se asemejaban a los genes correspondientes en células eucariotas. Esta observación encaja muy bien con el esquema de la figura 3*a*). Por el contrario, muchos de los genes en las arqueobacterias que codifican las enzimas del metabolismo exhiben un carácter eubacteriano inconfundible.[11,12] Los genomas de las especies eubacteriales también mostraron evidencia de un origen mixto, que a menudo contenía un número significativo de genes que tenían un carácter arqueobacteriano.[13]

La mayoría de los investigadores que estudian el origen de los organismos antiguos se han apegado al esquema básico del árbol filogenético, como se establece en la figura 3*a*), y argumentan que la presencia de genes similares a las eubacterias en las arqueobacterias, y viceversa, es el resultado de la transferencia de genes de una especie a otra, un fenómeno conocido como *transferencia horizontal de genes* (*HGT, horizontal gene transfer*), a veces también llamado *transferencia lateral de genes*.[14] De acuerdo con la premisa original que condujo al árbol filogenético de la figura 3*a*), los genes se heredan de los padres de uno, no de los vecinos. Esta es la premisa que permite a un investigador concluir que dos especies están estrechamente relacionadas cuando ambas poseen un gen (p. ej., el gen del rRNA) de una secuencia de nucleótidos similar. Sin embargo, si las células pueden captar genes de otras especies en su entorno, entonces dos especies que en realidad no están relacionadas pueden poseer genes de secuencia muy similar. Una primera medida de la importancia de la transferencia horizontal de genes en la evolución de las procariotas provino de un estudio que comparó los genomas de dos eubacterias relacionadas, *Escherichia* y *Salmonella*. Se encontró que 755 genes o casi 20% del genoma de *E. coli* se deriva de genes "extraños" transferidos al genoma de *E. coli* en los últimos 100 millones de años, que es el momento en que las dos eubacterias divergieron. Estos 755 genes se adquirieron como resultado de, al menos, 234 transferencias laterales separadas, provenientes de muchas fuentes distintas.[15] (El efecto de la transferencia horizontal de genes sobre la resistencia a antibióticos en bacterias patógenas se analiza en "Perspectiva humana", del capítulo 3).

Si los genomas son un mosaico compuesto por genes de diversas fuentes, ¿cómo se eligen los genes que se utilizarán para determinar las relaciones filogenéticas? De acuerdo con un punto de vista, los genes que participan en actividades informativas (transcripción, traducción, replicación) son los mejores sujetos para determinar las relaciones filogenéticas, ya que es menos probable que estos genes se transfieran lateralmente en comparación con los genes implicados en las reacciones metabólicas.[16] Estos autores argumentan que los productos de genes informativos (p. ej., rRNA) son partes de grandes complejos cuyos componentes deben interactuar con muchas otras moléculas. Es poco probable que un producto genético extraño pueda integrarse en la maquinaria existente. Cuando se usan "genes informativos" como sujetos de comparación, las arqueobacterias y eubacterias tienden a separarse en grupos claramente diferentes, mientras que las arqueobacterias y las eucariotas tienden a agruparse como parientes evolutivos, como lo hacen en la figura 3. Véase la referencia 17 para un análisis adicional.

El análisis de los genomas eucarióticos ha producido evidencia similar de un patrimonio mixto. Los estudios del genoma de la levadura muestran la presencia inconfundible de genes derivados tanto de las arqueobacterias como de las eubacterias. Los "genes informativos" tienden a mostrar propiedades de arqueobacteria, y los "genes metabólicos", características de eubacteria.[18] Hay varias explicaciones posibles para el carácter mixto del genoma eucariota. Las células eucariotas pueden haber evolucionado a partir de antepasados arqueobacterianos y luego recogieron genes de eubacterias con las que compartieron ambientes. Además, algunos de los genes en el núcleo de una célula eucariota se derivan claramente de genes eubacteriales que se han transferido del genoma de los simbiontes que evolucionaron a mitocondrias y cloroplastos.[19] Un número de investigadores ha adoptado una posición más radical y ha propuesto que el genoma eucariota se derivó, en su origen, de la fusión de una célula arquebacteriana y una célula eubacteriana, seguida de la integración de sus dos genomas.[p. ej., 20] Dadas estas diversas rutas de adquisición de genes, es evidente que ningún árbol filogenético simple, como el que se muestra en la figura 3*a*), puede representar la historia evolutiva de todo el genoma de un organismo.[Reseñado en 21-23] En cambio, cada gen o grupo de genes de un genoma particular puede tener su propio árbol evolutivo único, lo que puede ser una idea desconcertante para los científicos que buscan determinar el origen de nuestros primeros ancestros eucarióticos.

# Referencias


1. Sagan (Margulis), L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 1967;14:225-274.
2. Santarella-Mellwig, R. Three-dimensional reconstruction of bacteria with a complex endomembrane system. *PLoS Biology* 2013; 11:e1001565.
3. Spiegel, F. W. Contemplating the first Plantae. *Science* 2012;335: 809-810.
4. Zuckerkandl, E. y Pauling, L. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* 1965;8:357-365.
5. Zablen, L. B., *et al*. Phylogenetic origin of the chloroplast and prokaryotic nature of its ribosomal RNA. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1975;72:2418-2422.
6. Woese, C. R. y Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1977;74: 5088-5090.
7. Iwabe, N., *et al*. Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1989;86:9355-9359.
8. Gogarten, J. P., *et al*. Evolution of the vacuolar H + -ATPase: Implications for the origin of eukaryotes. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1989;86:6661-6665.
9. Woese, C., *et al*. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1990;87:4576-4579.
10. Doolittle, W. F. Lateral genomics. *Trends Biochem Sci* 1999 Dic; 24:M5-M8(Dec.)
11. Bult, C. J., *et al*. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii. Science* 1996;273: 1058-1073.
12. Koonin, E. V., *et al*. Comparison of archaeal and bacterial genomes. *Mol Microbiol* 1997;25:619-637.
13. Nelson, K. E., *et al*. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritime. Nature* 1999;399:323-329.

14 Ochman, H., *et al*. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000;405:299-304.
15. Lawrence, J. G. y Ochman, H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1998;95:9413-9417.
16. Jain, R., *et al*. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1999;96:3801-3806.
17. McInerney, J. O. y Pisani, D. Paradigm for life. *Science* 2007; 318: 1390-1391.
18. Rivera, M. C., *et al*. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1998;95:6239-6244.
19. Timmis, J. N., *et al*. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Rev Gen* 2004;5: 123-135.
20. Martin, W. y Muller, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 1998;392:37-41.
21. Zimmer, C. On the origin of eukaryotes. *Science* 2009;325: 666-668.
22. Steel, M. y Penny, D. Common ancestry put to the test. *Nature* 2010;465:168-169.
23. Wilson, K. L. y Dawson, S. C. Functional evolution of nuclear structure. *J Cell Biol* 2011;195:171-181.


# Preguntas analíticas

1. Considere algunas preguntas sobre la estructura o función de la célula que le interesaría responder. ¿Los datos requeridos para responder a las preguntas serían más fáciles de recopilar trabajando con una planta o un animal completo, o con una población de células cultivadas? ¿Cuáles podrían ser las ventajas y desventajas de trabajar con un organismo completo *versus* un cultivo celular?
2. La figura 1-3 muestra una célula epitelial intestinal con grandes cantidades de microvellosidades. ¿Cuál es la ventaja para el organismo de tener estas microvellosidades? ¿Qué espera que le suceda a un individuo que carezca de tales microvellosidades como resultado de una mutación heredada?
3. Las primeras células humanas que se cultivaron con éxito se derivaron de un tumor maligno. ¿Cree que esto simplemente refleja la disponibilidad de células cancerosas o que podrían ser mejores sujetos para el cultivo celular? ¿Por qué?
4. Los dibujos de células de plantas y animales en la figura 1-8*b*), *c*) incluyen ciertas estructuras que están presentes en las células de las plantas, pero ausentes en las células de los animales. ¿Cómo cree que cada una de estas estructuras afecta la vida de la planta?
5. Se observó que las células poseen receptores en su superficie que les permiten responder a estímulos específicos. Muchas células en el cuerpo humano poseen receptores que les permiten unirse a hormonas específicas que circulan en la sangre. ¿Por qué cree que estos receptores de hormonas son importantes? ¿Cuál sería el efecto sobre las actividades fisiológicas del cuerpo si las células carecieran de estos receptores, o si todas las células tuvieran los mismos receptores?
6. Si argumentara que los virus son organismos vivos, ¿qué características de la estructura y función virales podría usar en su argumento?
7. Si suponemos que las actividades dentro de las células ocurren de manera análoga a la que se muestra en la caricatura de Rube Goldberg de la figura 1-7, ¿cómo sería esto diferente de una actividad humana, como construir un automóvil en una línea de ensamblaje o disparar un tiro libre en un juego de baloncesto?
8. A diferencia de las células bacterianas, el núcleo de una célula eucariota está delimitado por una membrana de doble capa tachonada por poros complejos. ¿Cómo cree que esto podría afectar el tráfico entre el DNA y el citoplasma de una célula eucariota en comparación con el de una célula procariota?
9. Examine la fotografía del protista ciliado en la figura 1-16 y considere algunas de las actividades en las que esta célula se ve envuelta, que una célula muscular o nerviosa en su cuerpo no capta.
10. ¿Qué tipo de célula esperaría que alcanzara el mayor volumen: una celda altamente aplanada o una celda esférica? ¿Por qué? (véase **video tutorial cuantitativo**).
11. Supongamos que usted es un científico que vivió en la década de 1890 y estaba estudiando una enfermedad de los cultivos de tabaco que atrofiaba el crecimiento de las plantas y manchaba sus hojas. Usted encuentra que la savia de una planta enferma, cuando se agrega a una planta sana, es capaz de transmitir la enfermedad a esa planta. Examina la savia en los mejores microscopios ópticos del periodo y no ve evidencia de bacterias. Fuerza la savia a través de filtros, cuyos poros son tan pequeños que retrasan el paso de la bacteria más pequeña conocida, pero el fluido que pasa a través de los filtros todavía puede transmitir la enfermedad. Al igual que Dimitri Ivanovsky, quien realizó estos experimentos hace más de cien años, probablemente concluiría que el agente infeccioso era un tipo desconocido de bacteria inusualmente pequeña. ¿Qué tipo de experimentos podría realizar hoy para probar esta hipótesis?
12. La mayoría de los biólogos evolutivos creen que todas las mitocondrias han evolucionado a partir de una única mitocondria ancestral, y que todos los cloroplastos han evolucionado a partir de un único cloroplasto ancestral. En otras palabras, el evento simbiótico que dio lugar a cada uno de estos organelos ocurrió solo una vez. Si este es el caso, ¿dónde ubicaría la adquisición de cada uno de estos organelos en el árbol filogenético de la figura 3*a*) de la sección "Vías experimentales", página 28?
13. La publicación de la secuencia completa del virus de la influenza de 1918 y la reconstitución de partículas víricas activas enfrentaron una gran controversia. Los que favorecieron la publicación del trabajo argumentaron que este tipo de información puede ayudar a comprender mejor la virulencia de los virus de la influenza y ayudar a desarrollar mejores terapias contra ellos. Quienes se opusieron a su publicación argumentaron que el virus podría ser reconstituido por bioterroristas, o que otra pandemia podría crearse debido a la liberación accidental del virus por un investigador descuidado. ¿Cuál es su opinión sobre los méritos de realizar este tipo de trabajo?

CAPÍTULO 2

# Las bases químicas de la vida

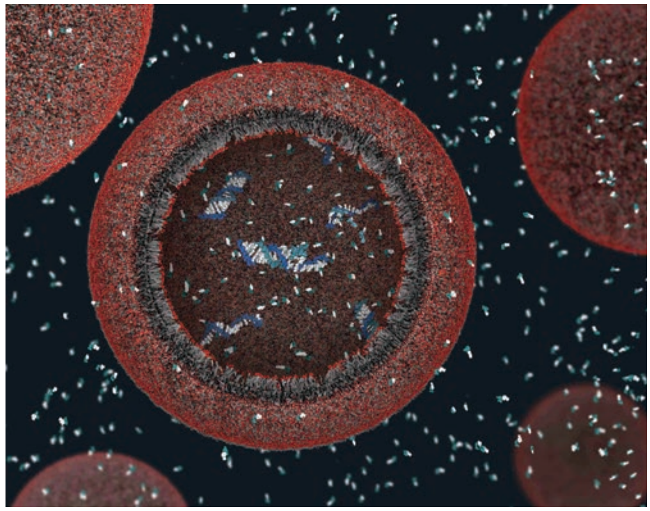
## EL ORIGEN QUÍMICO DE LA VIDA

Hace alrededor de 4 600 millones de años, nuestro sistema solar se formó a partir de una enorme nube giratoria de gas y polvo. Durante sus primeros 1 000 millones de años, la Tierra fue un lugar tumultuoso, con violentas erupciones volcánicas y colisiones casi constantes con asteroides. Sin embargo, es durante este periodo que los científicos creen que la vida, en forma de células primitivas, apareció por primera vez en el planeta. Se cree que los microbios antiguos crearon formaciones rocosas estratificadas, llamadas estromatolitos, lo que sugiere que la vida pudo haber proliferado hace 3.5 000 millones de años.

Los investigadores han planteado la hipótesis de que las células más antiguas (llamadas protocélulas) eran muy simples, formadas solo por ácidos nucleicos (como el DNA o el RNA) rodeados por una membrana, y que estas células pueden haberse formado en charcos de agua cálida o en el océano cerca de los respiraderos de aguas profundas. Sin embargo, un dilema central ha sido comprender cómo las moléculas de ácido nucleico y de membrana se formaron espontáneamente en un planeta tan joven: cómo, en esencia, la biología nació de la química.

En 1952, Harold Urey y su estudiante graduado, Stanley Miller, diseñaron un experimento para probar si las condiciones en la Tierra primitiva favorecieron la síntesis espontánea de moléculas biológicas. Ellos simularon la atmósfera primitiva de la Tierra haciendo circular agua, metano, amoniaco e

(*continúa*)



Construir la vida desde el principio: la representación por computadora de una protocélula, una vesícula lipídica artificial que contiene ácidos nucleicos autorreplicantes. La capacidad de tales protocélulas para autoensamblarse y replicarse cuando se les suministra la combinación correcta de bloques de construcción químicos subraya el papel crítico de la química en los orígenes de la vida.

FUENTE: Imagen creada por Janet Iwasa. Usada con permiso.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


2.1 Enlaces covalentes
2.2 PERSPECTIVA HUMANA: ¿Los radicales libres causan envejecimiento?
2.3 Enlaces no covalentes
2.4 Ácidos, bases y tampones
2.5 La naturaleza de las moléculas biológicas
2.6 Carbohidratos
2.7 Lípidos
2.8 Bloques de construcción de proteínas
2.9 Estructuras primarias y secundarias de las proteínas
2.10 Estructura terciaria de las proteínas
2.11 Estructura cuaternaria de las proteínas
2.12 Plegamiento de las proteínas
2.13 PERSPECTIVA HUMANA: El plegamiento incorrecto de las proteínas puede tener consecuencias mortales
2.14 VÍAS EXPERIMENTALES: Las proteínas que ayudan a los chaperones alcanzan su estado plegado correcto
2.15 Proteómica e interactómica
2.16 Ingeniería de las proteínas
2.17 Adaptación y evolución de las proteínas
2.18 Ácidos nucleicos
2.19 La formación de estructuras macromoleculares complejas

hidrógeno en un aparato de vidrio sellado e introduciendo energía en forma de calor y electricidad (que imitaba el efecto del rayo). En el transcurso de dos semanas, el vidrio se recubrió con compuestos orgánicos que incluían una variedad de aminoácidos y azúcares, lo que apoya la idea de que las condiciones en el joven planeta pueden haber sido ideales para crear los compuestos orgánicos que finalmente se incorporaron a las células tempranas.

En los últimos años, los investigadores han encontrado vías prebióticamente factibles para crear una serie de moléculas adicionales, incluidos los ribonucleótidos y los ácidos grasos, los componentes básicos del RNA y las membranas. Algunos laboratorios están tratando de encontrar condiciones que permitan la formación de protocélulas.

Hay muchos misterios que aún permanecen. Las moléculas creadas por el experimento de Miller-Urey tienden a ser una mezcla uniforme de isómeros izquierdos y diestros (que son imágenes especulares entre sí), pero toda la vida en la Tierra usa solo aminoácidos zurdos y azúcares diestros. ¿Cómo y por qué surgió esta selección?



## 2.1 Enlaces covalentes

Comenzaremos este capítulo con un breve examen de la base atómica de la materia viva. El nivel de organización celular está solo a un pequeño paso del nivel atómico, como será evidente cuando examinemos la importancia del movimiento de unos pocos átomos de una molécula durante actividades como la contracción muscular o el transporte de sustancias a través de las membranas celulares. Las propiedades de las células y sus organelos derivan directamente de las actividades de las moléculas de las que están compuestas. Considérese un proceso como la división celular, que se puede observar con gran detalle bajo un simple microscopio óptico. Para comprender las actividades que ocurren cuando una célula se divide, se necesita saber, por ejemplo, sobre las interacciones entre el DNA y las moléculas proteicas que hacen que los cromosomas se condensen en estructuras empaquetadas semejantes a un bastón que se pueden separar en diferentes células; la construcción molecular de microtúbulos que contienen proteínas que les permite desensamblarse en un momento en la célula y volver a ensamblarse al siguiente momento en una ubicación celular completamente diferente; además de las propiedades de las moléculas de los lípidos que hacen que la membrana celular externa sea deformable, de modo que pueda ser arrastrada hacia el centro de una célula y así, divida la célula en dos. Es imposible incluso comenzar a comprender la función celular sin un conocimiento razonable de la estructura y las propiedades de los principales tipos de moléculas biológicas. Este es el objetivo del presente capítulo: proporcionar una comprensión de la química que permite que ocurran los eventos biológicos, dando lugar a la vida. Comenzaremos considerando los tipos de enlaces que los átomos pueden formar entre sí.

Los átomos que componen una molécula están unidos por **enlaces covalentes** en los que pares de electrones se comparten entre pares de átomos. La formación de un enlace covalente entre dos átomos se rige por el principio fundamental de que un átomo es más estable cuando se llena su capa externa de electrones. En consecuencia, el número de los enlaces que un átomo puede formar depende del número de electrones necesarios para llenar su capa exterior.

La estructura electrónica de varios átomos se muestra en la **FIGURA 2-1**. La capa externa (y única) de un átomo de hidrógeno o helio se llena cuando contiene dos electrones; las capas exteriores de los otros átomos en la figura 2-1 se llenan cuando contienen ocho electrones. Por tanto, un átomo de oxígeno, con seis electrones de capa externa, puede llenar su cubierta externa al combinarse con dos átomos de hidrógeno, formando una molécula de agua. El átomo de oxígeno está unido a cada átomo de hidrógeno por un único enlace covalente (denominado H:O o H—O). La formación de un enlace covalente se acompaña de la liberación de energía, que debe reabsorberse en algún momento posterior si se va a romper el enlace. La energía requerida para dividir los enlaces covalentes C—H, C—C o C—O es bastante grande, típicamente entre 80 y 100 kilocalorías por mol (kcal/mol)[1] de moléculas. En comparación, la energía térmica de una molécula es de solo 0.6 kcal/mol. Las vibraciones térmicas que actúan sobre una molécula son demasiado débiles para romper un enlace covalente, lo que hace que estos enlaces sean estables en casi todas las condiciones. En este capítulo, cuando hablamos de que los enlaces son fuertes, queremos decir que la energía requerida para romper el enlace es mucho mayor que la energía térmica de la molécula. Por el contrario, cuando hablamos de que los enlaces son débiles, nos referimos a que la energía requerida para romper el enlace es de la misma magnitud o más pequeña que la energía térmica.

En muchos casos, dos átomos pueden unirse por enlaces en los que se comparten más de un par de electrones. Si se comparten dos pares de electrones, como ocurre en el oxígeno molecular ($O_2$), el enlace covalente es un *enlace doble*, y si se comparten tres pares de electrones (como en el nitrógeno molecular, $N_2$), se trata de un *enlace triple*. Los enlaces cuádruples no ocurren. El tipo de enlace entre los átomos tiene importantes consecuencias para determinar las formas de las moléculas. Por ejemplo, los átomos unidos por un enlace simple son capaces de rotar uno con respecto al otro, mientras que los átomos del enlace doble (y triple) carecen de esta capacidad. Como se ilustra en la figura 6-6, los dobles enlaces pueden funcionar como centros de captura de energía, impulsando procesos vitales como la respiración y la fotosíntesis.

Cuando los átomos del mismo elemento se unen entre sí, como en $H_2$, los pares de electrones de la capa externa se comparten por igual entre los dos átomos unidos. Sin embargo, cuando dos átomos diferentes están unidos covalentemente, el núcleo con carga positiva de un átomo ejerce una mayor fuerza de atracción sobre los electrones externos que el otro. En consecuencia, los electrones compartidos tienden a estar ubicados más cerca del átomo con mayor fuerza de atracción, es decir, el **átomo más electronegativo**. Entre los átomos más comúnmente presentes en las moléculas biológicas, el nitrógeno y el oxígeno son fuertemente electronegativos.

[1] Una caloría es la cantidad de energía térmica requerida para elevar la temperatura de un gramo de agua en un grado celsius. Una kilocaloría (kcal) equivale a 1 000 calorías (o una gran caloría). Además de las calorías, la energía también se puede expresar en julios, que es un término que se utilizó históricamente para medir la energía en forma de trabajo. Una kilocaloría equivale a 4 186 julios. Por el contrario, 1 julio = 0.239 calorías. Un mol es igual al número de Avogadro ($6 \times 10^{23}$) de moléculas. Un mol de una sustancia es su peso molecular expresado en gramos.

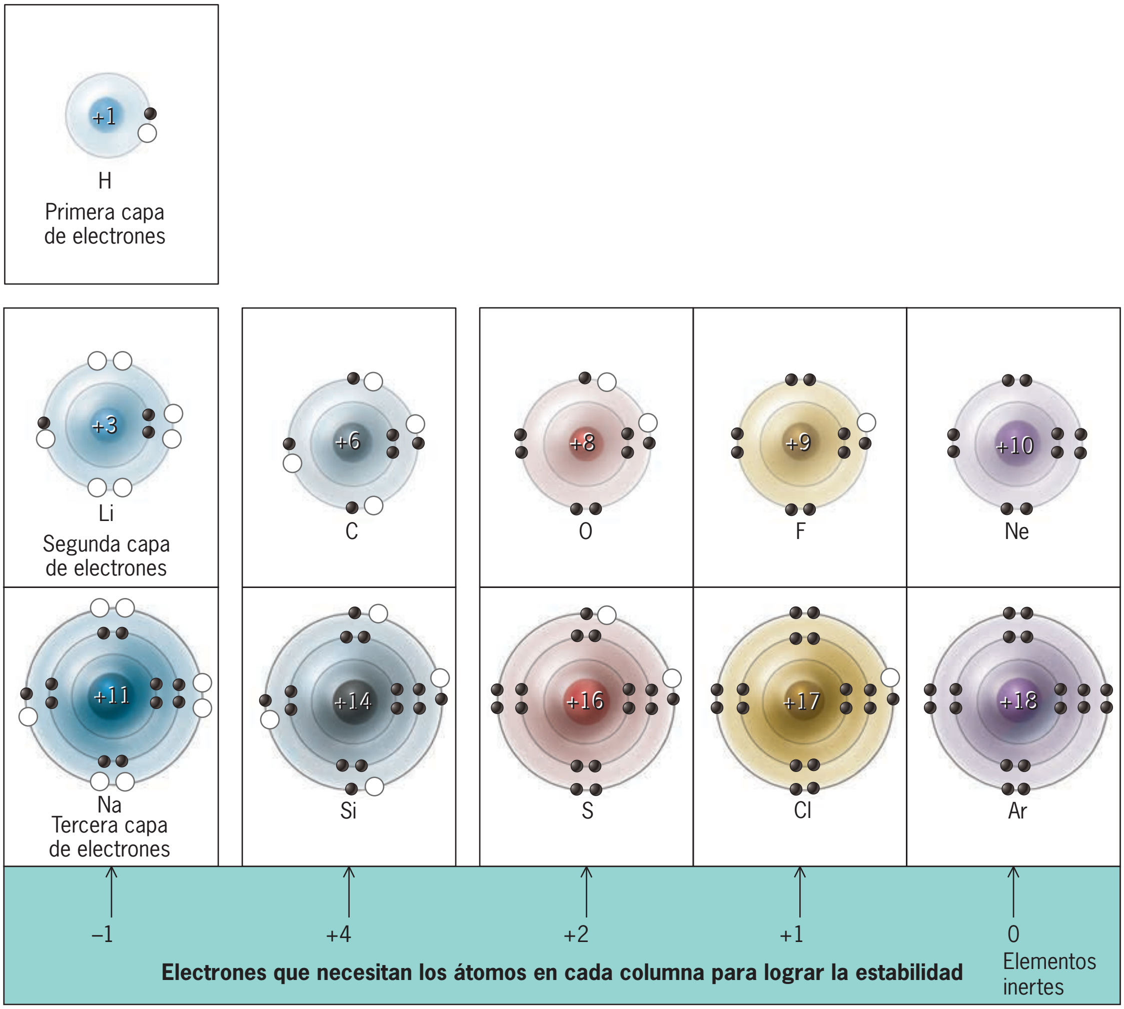
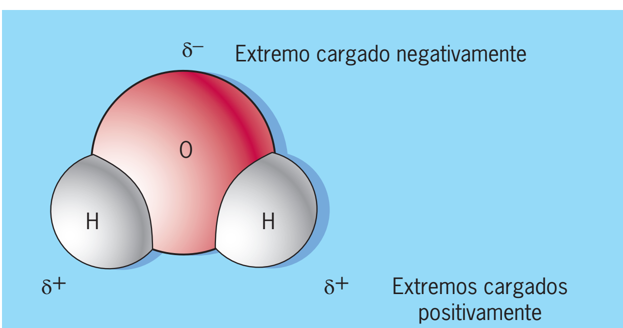



**FIGURA 2-1 Una representación de la disposición de electrones en varios átomos comunes.** Los electrones están presentes alrededor del núcleo de un átomo en "nubes" u orbitales que están aproximadamente definidos por sus límites, que pueden tener una forma esférica o de pesa. Cada orbital contiene un máximo de dos electrones, por lo que los electrones (puntos oscuros en el dibujo) se agrupan en pares. La capa más interna contiene un único orbital (por tanto, dos electrones), la segunda capa contiene cuatro orbitales (por tanto, ocho electrones) y la tercera capa también contiene cuatro orbitales. El número de electrones de la capa externa es el determinante principal de las propiedades químicas de un elemento. Los átomos con una cantidad similar de electrones de capa externa tienen propiedades similares. El litio (Li) y el sodio (Na), por ejemplo, tienen un electrón externo, y ambos son metales altamente reactivos. Los átomos de carbono (C) y de silicio (Si) pueden unirse con cuatro átomos diferentes. Sin embargo, debido a su tamaño, un átomo de carbono puede unirse a otros átomos de carbono, formando moléculas orgánicas de cadena larga, mientras que el silicio es incapaz de formar moléculas comparables. El Neón (Ne) y el argón (Ar) tienen completa su órbita externa, lo que hace que estos átomos sean apenas reactivos; se los conoce como gases inertes.

## Moléculas polares y no polares

Examinemos una molécula de agua. El único átomo de oxígeno del agua atrae a los electrones con mucha más fuerza que cualquiera de sus átomos de hidrógeno. Como resultado, se dice que los enlaces O—H de una molécula de agua están *polarizados*, de modo que uno de los átomos tiene una carga negativa parcial y el otro una carga positiva parcial. Esto generalmente se denota en la ilustración.




Las moléculas, como el agua, que tienen una distribución asimétrica de carga (o *dipolo*) se denominan moléculas **polares**. Las moléculas polares de importancia biológica contienen uno o más átomos electronegativos, generalmente O, N y/o S. Se dice que las moléculas que carecen de átomos electronegativos y enlaces fuertemente polarizados, como moléculas formadas solo por átomos de carbono e hidrógeno, son **no polares**. La presencia de enlaces muy polarizados es de suma importancia para determinar la reactividad de las moléculas. Las moléculas no polares grandes, como las ceras y las grasas, son relativamente inertes. Algunas de las moléculas biológicas más interesantes, incluidas las proteínas y los fosfolípidos, contienen regiones polares y no polares, que se comportan de manera muy diferente.

## Ionización

Algunos átomos son tan fuertemente electronegativos que pueden capturar electrones de otros átomos durante una reacción química. Por ejemplo, cuando los elementos sodio (un metal de

color plateado) y cloro (un gas tóxico) se mezclan, el electrón individual en la capa externa de cada átomo de sodio migra al átomo de cloro con deficiencia de electrones. Como resultado, estos dos átomos se transforman en **iones** cargados.

$$2\,Na\cdot + :\ddot{\underset{..}{Cl}}:\ddot{\underset{..}{Cl}}: \rightarrow 2\,Na:\ddot{\underset{..}{Cl}}: \rightarrow 2\,Na^{+} + 2\,:\ddot{\underset{..}{Cl}}:^{-}$$

Debido a que el ion cloruro tiene un electrón extra (relativo al número de protones en su núcleo), tiene una carga negativa ($Cl^-$) y se denomina **anión**. El átomo de sodio, que ha perdido un electrón, tiene una carga positiva adicional ($Na^+$) y se denomina **catión**. Cuando están presentes en cristales, estos dos iones forman cloruro de sodio o sal de mesa.

Los iones $Na^+$ y $Cl^-$ representados anteriormente son relativamente estables porque poseen capas externas rellenas. Una disposición diferente de electrones dentro de un átomo puede producir una especie altamente reactiva, llamada *radical libre*. La estructura de los radicales libres y su importancia en la biología se consideran en la sección adjunta "Perspectiva humana".

### REPASO

1. Los átomos de oxígeno tienen ocho protones en su núcleo. ¿Cuántos electrones poseen? ¿Cuántos orbitales hay en la capa interna de electrones? ¿Cuántos electrones hay en la capa exterior? ¿Cuántos electrones puede contener la capa exterior antes de completarse?
2. Compare y confronte: un átomo de sodio y un ion de sodio; un enlace simple y un enlace doble; un átomo de baja electronegatividad y otro de alta; la distribución de electrones alrededor de un átomo de oxígeno unido a otro átomo de oxígeno, y un átomo de oxígeno unido a dos átomos de hidrógeno.

# 2.2 PERSPECTIVA HUMANA

## ¿Los radicales libres causan envejecimiento?

Durante el transcurso de este libro de texto, discutiremos varios factores biológicos diferentes que se cree que contribuyen al proceso del envejecimiento. Aquí consideraremos a un actor que durante mucho tiempo se ha imaginado que conduce el envejecimiento: la acumulación gradual de daños en los tejidos de nuestro cuerpo. Esta idea es atractiva porque introduce un elemento natural del tiempo: siempre que el daño ocurra a una tasa constante baja, cuanto más tiempo viva, más daño acumulará. Pero aunque esta idea es atractiva, en realidad, probarla requiere conocer el origen del daño y luego preguntar si el cambio en la tasa de daño realmente altera el envejecimiento. ¿Qué se está dañando y qué está provocando ese daño? El daño más destructivo probablemente ocurre con el DNA. Las alteraciones en el DNA conducen a la producción de mensajes genéticos defectuosos que promueven el deterioro celular gradual. ¿Cómo ocurre el daño celular, y por qué debería ocurrir más rápidamente en un animal con una vida más corta, como un chimpancé, que un humano? La respuesta puede residir en el nivel atómico.

Los átomos se estabilizan cuando sus capas están llenas de electrones. Las capas de electrones consisten en orbitales, cada uno de los cuales puede contener un máximo de dos electrones. Los átomos o moléculas que tienen orbitales que contienen un solo electrón no pareado tienden a ser altamente inestables, se llaman **radicales libres**. Los radicales libres pueden formarse cuando se rompe un enlace covalente de modo que cada parte conserva la mitad de los electrones compartidos, o se pueden formar cuando un átomo o molécula acepta un único electrón transferido durante una reacción de oxidación-reducción. Por ejemplo, el agua se puede convertir en radicales libres cuando se expone a la radiación del sol:

$$H_2O \rightarrow HO\cdot + H\cdot$$

radical hidroxilo
("•" indica un radical libre)

Los radicales libres son extremadamente reactivos y capaces de alterar químicamente muchos tipos de moléculas, incluidas proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Esto se ilustra por el hecho de que ciertas células del sistema inmune generan radicales libres dentro de su citoplasma como un medio para matar las bacterias que estas células inmunes han ingerido. La formación de radicales hidroxilo es probablemente una de las principales razones por las cuales la luz del sol es tan dañina para la piel.

En 1956, Denham Harman, de la Universidad de Nebraska, propuso que el envejecimiento resulta del daño tisular causado por los radicales libres. Debido a que el tema de los radicales libres no era uno con el que los biólogos y los médicos estuvieran familiarizados, la propuesta no generó un interés significativo. Luego, en 1969, Joe McCord e Irwin Fridovich de la Universidad de Duke descubrieron una enzima, la superóxido dismutasa (SOD, *superoxide dismutase*), cuya única función era la destrucción del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), un tipo de radical libre que se forma cuando el oxígeno molecular aumenta un electrón extra. La SOD cataliza la siguiente reacción:

$$O_2\cdot^- + O_2\cdot^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

peróxido
de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno también es un agente oxidante potencialmente reactivo, por lo que a menudo se usa como desinfectante y agente blanqueador. Si no se destruye rápidamente, el $H_2O_2$ puede descomponerse para formar radicales hidroxilo que atacan las macromoléculas de la célula. El peróxido de hidrógeno normalmente se destruye en la célula por la enzima catalasa o glutatión peroxidasa.

La investigación posterior ha revelado que los radicales superóxido se forman dentro de las células durante el metabolismo oxidativo normal y que una superóxido dismutasa está presente en las células de diversos organismos, desde las bacterias hasta los humanos. De hecho, los animales poseen tres versiones diferentes (isoformas) de SOD: una isoforma citosólica, una mitocondrial y otra extracelular. Se estima que entre el 1-2% del oxígeno tomado en las mitocondrias humanas se puede convertir en peróxido de hidrógeno en lugar de agua, el producto final normal de la respiración. La importancia de la SOD se revela más claramente en estudios de bacterias mutantes y levaduras que carecen de la enzima; estas células no pueden crecer en presencia de oxígeno. Del mismo modo, los ratones que carecen de la versión mitocondrial de la enzima (SOD2) no pueden sobrevivir relativamente más de una semana después de nacer. Por el contrario, los ratones que han sido modificados genéticamente para

que sus mitocondrias contengan niveles elevados de la enzima catalasa que destruye el $H_2O_2$ viven un 20% más de tiempo, en promedio, que los controles no tratados. Este hallazgo, reportado en 2005, marcó la primera demostración de que las defensas antioxidantes mejoradas pueden aumentar la vida útil de un mamífero. Aunque el potencial destructivo de los radicales libres, como los radicales superóxido e hidroxilo, es incuestionable, la importancia de estos agentes como factor en el envejecimiento continúa siendo controvertida. En algunos casos, se descubrió que las perturbaciones que aumentan los radicales de oxígeno aumentan la vida útil en lugar de disminuirla. Además, el concepto de que el envejecimiento involucra la acumulación de daño aleatorio ha sido cuestionado por el descubrimiento de genes específicos en organismos modelo como la levadura y los gusanos nematodos que, cuando están mutados, permiten que el organismo viva mucho más tiempo. La existencia de tales genes ha llevado a una teoría competitiva conocida como "envejecimiento programado", que postula que los organismos han desarrollado mecanismos para inducir su propia disminución después de que hayan pasado la edad reproductiva. El grado en que el daño de los radicales libres determina el envejecimiento es, por tanto, una pregunta abierta.

Un área relacionada de investigación se refiere al estudio de sustancias llamadas antioxidantes que pueden destruir los radicales libres en el tubo de ensayo. La venta de estas sustancias proporciona una importante fuente de ingresos para la industria de las vitaminas y los suplementos. Los antioxidantes comunes que se encuentran en el cuerpo incluyen al glutatión, las vitaminas E y C, y el betacaroteno (el pigmento naranja en las zanahorias y otras verduras). Aunque estas sustancias pueden resultar beneficiosas en la dieta debido a su capacidad para destruir los radicales libres, los estudios con ratas y ratones no han brindado pruebas convincentes de que retrasen el proceso de envejecimiento o aumenten la duración máxima de la vida.



## 2.3 Enlaces no covalentes

Los enlaces covalentes son enlaces fuertes entre los átomos que componen una molécula. Las interacciones entre moléculas (o entre diferentes partes de una molécula biológica grande) están gobernadas por una variedad de enlaces más débiles llamados *enlaces no covalentes*. Los **enlaces no covalentes** no dependen de electrones compartidos, sino de fuerzas atractivas entre átomos que tienen una carga opuesta. Los enlaces no covalentes individuales son débiles (aproximadamente de 1 a 5 kcal/mol) y, por tanto, se rompen y se reforman fácilmente. Como será evidente a lo largo de este libro, esta característica permite que los enlaces no covalentes medien las interacciones dinámicas entre las moléculas de la célula.

Aunque los enlaces individuales no covalentes son débiles, cuando un gran número de ellos actúa en concierto, como entre las dos cadenas de una molécula de DNA o entre diferentes partes de una proteína grande, sus fuerzas atractivas son aditivas. Tomadas en conjunto, proporcionan a la estructura una estabilidad considerable. Examinaremos varios tipos de enlaces no covalentes que son importantes en las células.

### Enlaces iónicos: atracciones entre átomos cargados

Un cristal de sal de mesa se mantiene unido por una atracción electrostática entre el $Na^+$ cargado positivamente y los iones $Cl^-$ cargados negativamente. Este tipo de atracción entre los componentes completamente cargados se llama **enlace iónico** (o *puente salino*). Los enlaces iónicos dentro de un cristal de sal pueden ser bastante fuertes. Sin embargo, si un cristal de sal se disuelve en agua, cada uno de los iones individuales se rodea de moléculas de agua, lo que impide que los iones cargados opuestamente se acerquen lo suficiente como para formar enlaces iónicos (**FIGURA 2-2**). Debido a que las células están compuestas principalmente de agua, los enlaces entre los iones *libres* son de poca importancia. Por el contrario, los enlaces iónicos débiles entre grupos de moléculas biológicas grandes cargados opuestamente son de considerable importancia. Por ejemplo, cuando los átomos de fosfato cargados negativamente en una molécula de DNA están estrechamente asociados con grupos cargados positivamente en la superficie de una proteína (**FIGURA 2-3**), los enlaces iónicos entre ellos ayudan a mantener unido el complejo. La fuerza de los enlaces iónicos en una célula es generalmente débil (alrededor de 3 kcal/mol) debido a la presencia de agua, pero en el interior del núcleo de una proteína, donde a menudo se excluye el agua, tales enlaces puede ser mucho más fuertes.

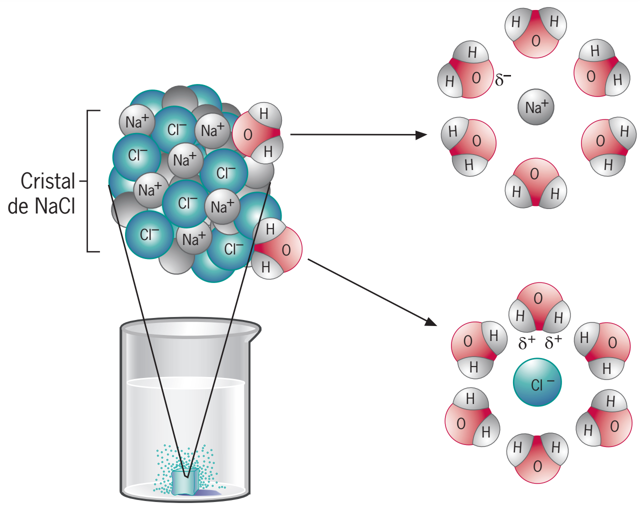



**FIGURA 2-2 La disolución de un cristal de sal**. Cuando se les coloca en el agua, los iones $Na^+$ y $Cl^-$ de un cristal de sal se rodean de moléculas de agua, rompiendo los enlaces iónicos entre los dos iones. A medida que la sal se disuelve, los átomos de oxígeno cargados negativamente de las moléculas de agua se asocian con los iones de sodio cargados positivamente, y los átomos de hidrógeno con carga positiva de las moléculas de agua se asocian con los iones cloruro de carga negativa.

### Enlaces de hidrógeno

Cuando un átomo de hidrógeno se une covalentemente a un átomo electronegativo, particularmente un átomo de oxígeno o nitrógeno, el único par de electrones compartidos se desplaza en gran medida hacia el núcleo del átomo electronegativo, dejando al átomo de hidrógeno con una carga positiva parcial. Esto se ilustra en la página 33 para la molécula de agua. Como resultado de este cambio de carga, el núcleo desnudo, positivamente cargado del átomo de hidrógeno, puede acercarse lo suficiente a un par no compartido de electrones externos de un segundo átomo electronegativo para formar una interacción de atracción (**FIGURA 2-4**). Esta débil interacción se llama **enlace de hidrógeno**. Los enlaces de hidrógeno entre o dentro de las moléculas en solución tienen una energía de aproximadamente 1 kcal/mol, que es similar en magnitud a la energía térmica. Como resultado, los enlaces de hidrógeno en las moléculas biológicas se rompen fácilmente.

Los enlaces de hidrógeno se producen entre las moléculas más polares y son particularmente importantes para determinar la estructura y las propiedades del agua (se discutirá más adelante). Los enlaces de hidrógeno también se forman entre los grupos polares presentes en moléculas biológicas grandes, como ocurre

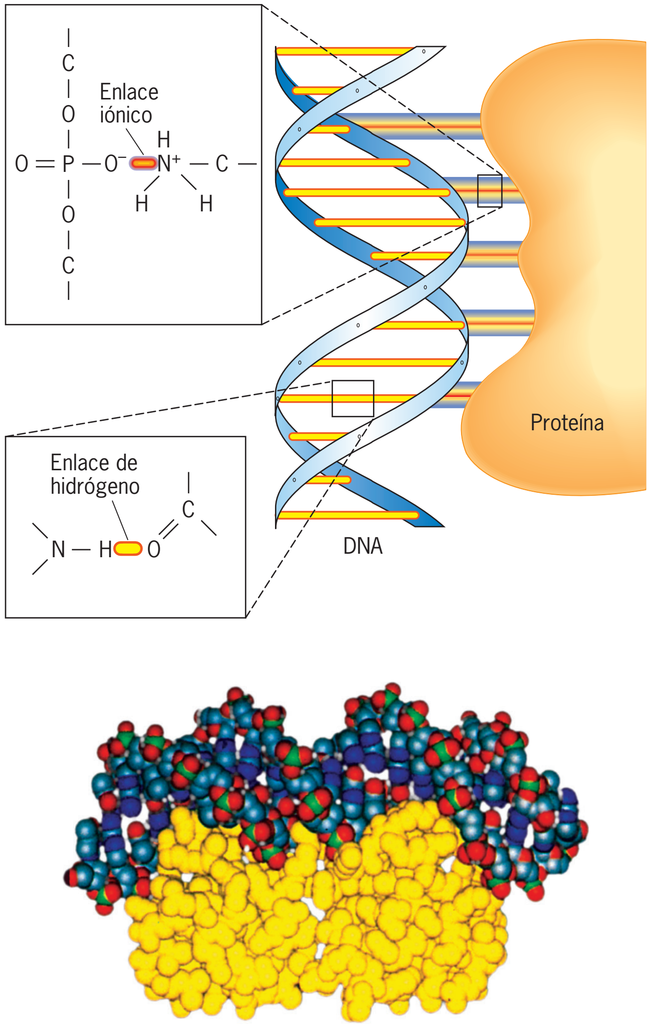



**FIGURA 2-3 Los enlaces iónicos no covalentes** desempeñan un papel importante al mantener la molécula de proteína a la derecha (átomos de color amarillo) en la molécula de DNA a la izquierda. Se forman enlaces iónicos entre los átomos de nitrógeno con carga positiva en la proteína y los átomos de oxígeno con carga negativa en el DNA. La molécula de DNA en sí misma consiste en dos cadenas separadas unidas por enlaces de hidrógeno no covalentes. Aunque un único enlace no covalente es relativamente débil y se rompe fácilmente, un gran número de estos enlaces entre dos moléculas, como entre dos cadenas de ADN, hace que el complejo general sea bastante estable.

FUENTE: Cortesía de Stephen Harrison, Departamento de Bioquímica de Harvard.

entre las dos cadenas de una molécula de DNA (véase figura 2-3). Debido a que su fuerza es aditiva, la gran cantidad de enlaces de hidrógeno entre las cadenas hace que la doble cadena de DNA sea una estructura estable. Sin embargo, debido a que los enlaces de hidrógeno individuales son débiles, las dos cadenas pueden separarse parcialmente para permitir el acceso de las enzimas a las cadenas individuales de la molécula de DNA.

## Interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals

Debido a su capacidad para interactuar con el agua, las moléculas polares, como azúcares y aminoácidos (descritas brevemente), son **hidrofílicas** o "amantes del agua". Las moléculas no polares, como las moléculas de esteroides o grasas, son esencialmente insolubles en agua porque carecen de las regiones cargadas que los atraerían a los polos de las moléculas de agua. Cuando los compuestos no polares se mezclan con agua, las moléculas no polares e **hidrófobas** ("temerosas del agua") se congregan a la fuerza, lo

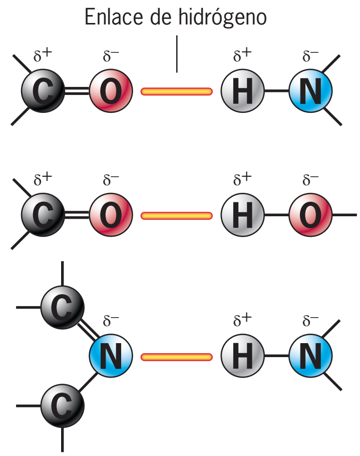



**FIGURA 2-4** Enlaces de hidrógeno formados entre un átomo electronegativo unido, como el nitrógeno o el oxígeno, que tiene una carga negativa parcial, y un átomo de hidrógeno unido, que tiene una carga positiva parcial. Los enlaces de hidrógeno (aproximadamente 0.18 nm) son típicamente alrededor de dos veces más largos que los enlaces covalentes mucho más fuertes.

que minimiza su exposición al entorno polar (**FIGURA 2-5**). Esta asociación de moléculas no polares se denomina **interacción hidrofóbica**. Esta es la razón por la que las gotitas de las moléculas de grasa reaparecen rápidamente en la superficie de la sopa de res o de pollo incluso después de que el líquido se agita con una cuchara.

Las interacciones hidrofóbicas del tipo que acabamos de describir no se clasifican como enlaces verdaderos porque no son el resultado de una atracción entre las moléculas hidrofóbicas, sino más bien de un impulso energético para excluir el agua de las superficies hidrofóbicas.[2] Además de este tipo de interacción, los grupos hidrofóbicos pueden formar enlaces débiles entre sí en función de las atracciones electrostáticas. Las moléculas polares se asocian porque contienen distribuciones de carga asimétricas permanentes dentro de su estructura. Un examen más detallado de los enlaces covalentes que componen una molécula no polar (como $H_2$ o $CH_4$) revela que las distribuciones de electrones no siempre son simétricas. La distribución de electrones alrededor de un átomo en un instante dado es un asunto estadístico y, por tanto, varía de un instante a otro. En consecuencia, en un momento dado, la densidad de electrones puede ser mayor en un lado de un átomo, incluso si el átomo comparte los electrones por igual con algún otro átomo. Estas asimetrías transitorias en la distribución de electrones resultan en separaciones momentáneas de carga (*dipolos*) dentro de la molécula. Si dos moléculas con dipolos transitorios están muy cerca la una de la otra y orientadas de la manera apropiada, experimentan una fuerza de atracción débil, llamada **fuerza de Van der Waals**, que las une. Además, la formación de una separación temporal de carga en una molécula puede *inducir* una separación similar en una molécula adyacente. De esta forma, se pueden generar fuerzas de atracción adicionales entre las moléculas no polares. Una sola fuerza de Van der Waals es muy débil (0.1 a 0.3 kcal/mol) y muy sensible a la distancia que separa los dos átomos (**FIGURA 2-6*a***). Como veremos en capítulos posteriores, sin embargo, las moléculas biológicas que interactúan entre sí —por ejemplo, un anticuerpo y una

[2] Esta afirmación refleja una hipótesis aceptada de que las interacciones hidrofóbicas son impulsadas por el aumento de la entropía (desorden). Cuando un grupo hidrofóbico se proyecta en un solvente acuoso, las moléculas de agua se ordenan en forma de caja alrededor del grupo hidrofóbico. Estas moléculas de disolvente se desordenan cuando el grupo hidrofóbico se retira del disolvente circundante. Se puede encontrar una discusión sobre este y otros puntos de vista en *Nature* 2005;437:640 y en *Curr Opin Struct Biol* 2006;16:152.

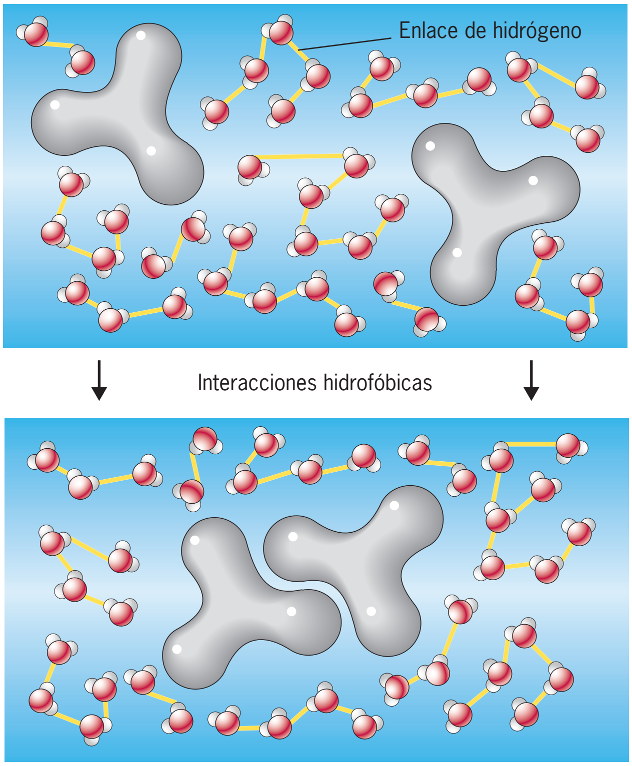



**FIGURA 2-5** En una interacción hidrofóbica, las moléculas no polares (hidrofóbicas) se reúnen en agregados, lo que minimiza su exposición a las moléculas de agua circundantes.

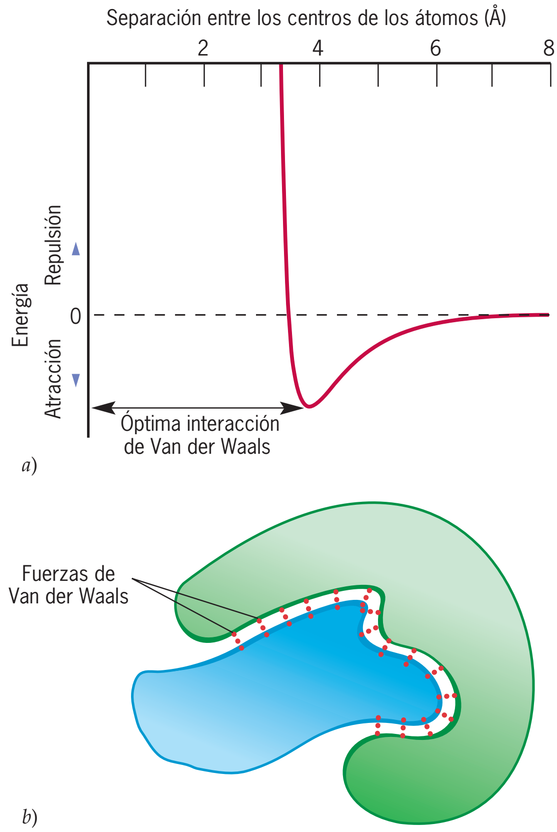



**FIGURA 2-6 Fuerzas de Van der Waals.** *a*) Cuando dos átomos se aproximan entre sí, experimentan una fuerza de atracción débil que aumenta hasta una distancia específica, típicamente alrededor de 4 Å. Si los átomos se acercan más de cerca, sus nubes de electrones se repelen entre sí, haciendo que los átomos se separen. *b*) Aunque las fuerzas individuales de Van der Waals son muy débiles y transitorias, se pueden formar grandes fuerzas atractivas si dos macromoléculas tienen una superficie complementaria, como se indica esquemáticamente en esta figura (la figura 2-40 presenta un ejemplo).

proteína en la superficie de un virus— a menudo poseen formas complementarias. Como resultado, muchos átomos de las moléculas que interactúan pueden tener la oportunidad de aproximarse de manera muy cercana (figura 2-6*b*), haciendo que las fuerzas de Van der Waals sean importantes en las interacciones biológicas.

## Las propiedades del agua que mantienen la vida

La vida en la Tierra depende totalmente del agua, y el agua puede ser esencial para la existencia de la vida en cualquier parte del universo. A pesar de que contiene solo tres átomos, una molécula de agua tiene una estructura única que le da a la molécula propiedades extraordinarias.[3] Lo más importante:

1. El agua es una molécula muy asimétrica con el átomo de oxígeno en un extremo y los dos átomos de hidrógeno en el extremo opuesto.
2. Cada uno de los dos enlaces covalentes en la molécula está altamente polarizado.
3. Los tres átomos en una molécula de agua son eficientes para formar enlaces de hidrógeno.

Los atributos del agua para mantener la vida provienen de estas propiedades.

Cada molécula de agua puede formar enlaces de hidrógeno con hasta cuatro moléculas de agua más, produciendo una red de moléculas altamente interconectadas (**FIGURA 2-7**). Cada enlace de hidrógeno se forma cuando el hidrógeno parcialmente cargado positivamente de una molécula de agua se alinea junto a un átomo de oxígeno cargado parcialmente negativo de otra molécula de agua. Debido a su extenso enlace de hidrógeno, las moléculas de agua tienen una tendencia inusualmente fuerte a adherirse

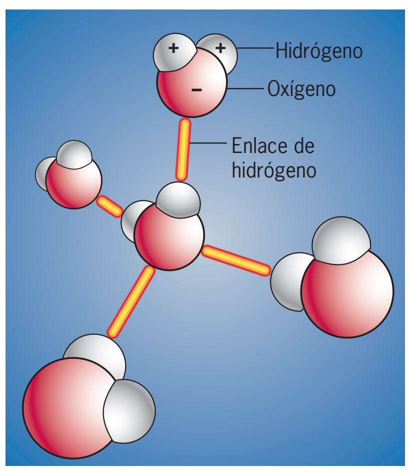



**FIGURA 2-7 Formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua contiguas.** Cada átomo de H de la molécula tiene aproximadamente cuatro décimas de una carga positiva completa, y el único átomo de O tiene aproximadamente ocho décimas de una carga negativa completa.

[3] Una forma de apreciar la estructura del agua es comparándola con el $H_2S$. Al igual que el oxígeno, el azufre tiene seis electrones de capa externa y forma enlaces simples con dos átomos de hidrógeno. Pero debido a que el azufre es un átomo más grande, es menos electronegativo que el oxígeno, y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno se reduce enormemente. A temperatura ambiente, $H_2S$ es un gas, no un líquido. De hecho, la temperatura debe bajar a –86 °C antes de que el $H_2S$ se congele en un sólido.

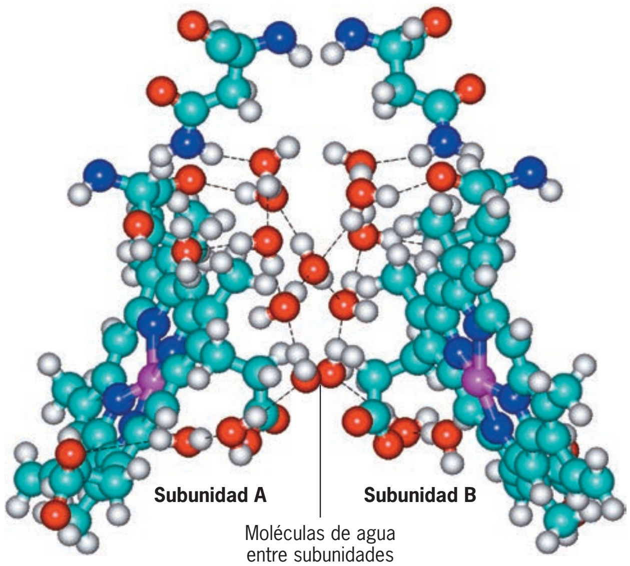



**FIGURA 2-8 La importancia del agua en la estructura de la proteína.** Las moléculas de agua (cada una con un solo átomo de oxígeno en color rojo y dos átomos de hidrógeno más pequeños en color gris) se muestran en sus ubicaciones ordenadas entre las dos subunidades de una molécula de hemoglobina de almeja.

FUENTE: Tomada de Martin Chaplin. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2006;7:864. © 2006; por Macmillan Publishers Limited.

entre sí. Esta característica es más evidente en las propiedades térmicas del agua. Por ejemplo, cuando el agua se calienta, la mayor parte de la energía térmica se consume interrumpiendo los enlaces de hidrógeno en lugar de contribuir al movimiento molecular (que se mide como un aumento de la temperatura). Del mismo modo, la evaporación del estado líquido al gaseoso requiere que las moléculas de agua rompan los enlaces de hidrógeno que las mantienen unidas a las moléculas contiguas, por eso se necesita tanta energía para convertir el agua en vapor. Los mamíferos aprovechan esta propiedad cuando sudan porque el cuerpo absorbe el calor necesario para evaporar el agua, que se enfría.

El pequeño volumen de fluido acuoso presente dentro de una célula contiene una mezcla notablemente compleja de sustancias disueltas o *solutos*. De hecho, el agua puede disolver más tipos de sustancias que cualquier otro solvente. Pero el agua es más que solo un solvente; determina la estructura de las moléculas biológicas y los tipos de interacciones en las que pueden participar. El agua es la matriz fluida alrededor de la cual se construye la estructura insoluble de la célula. También es el medio a través del cual los materiales se mueven de un compartimiento de la célula a otro; es un reactivo o producto en muchas reacciones celulares, y protege la célula de muchas maneras, desde calor excesivo, frío o radiación dañina.

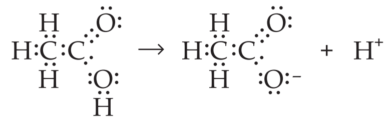
El agua es un factor tan importante en una célula porque es capaz de formar interacciones débiles con tantos tipos diferentes de grupos químicos. Recuerde de la página 35 cómo las moléculas de agua, con sus enlaces O—H fuertemente polarizados, forman una cubierta alrededor de los iones, separando los iones de los otros. De manera similar, las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con moléculas orgánicas que contienen grupos polares, como aminoácidos y azúcares, que aseguran su solubilidad dentro de la célula. El agua también desempeña un papel clave en el mantenimiento de la estructura y función de las macromoléculas y los complejos que forman (como las membranas). La **FIGURA 2-8** muestra la disposición ordenada de las moléculas de agua entre dos subunidades de una molécula de proteína. Las moléculas de agua están unidas por enlaces de hidrógeno entre sí y con aminoácidos específicos de la proteína.

**REPASO**

1. Describa algunas de las propiedades que distinguen los enlaces covalentes y no covalentes.
2. ¿Por qué las moléculas polares, como el azúcar de mesa, se disuelven tan fácilmente en el agua? ¿Por qué se forman gotitas de grasa en la superficie de una solución acuosa? ¿Por qué la sudoración ayuda a refrescar el cuerpo?

## 2.4 Ácidos, bases y tampones

Los protones no solo se encuentran dentro de los núcleos atómicos, sino que también se liberan en el medio cada vez que un átomo de hidrógeno pierde un electrón compartido. Considere el ácido acético —el ingrediente distintivo del vinagre— que puede experimentar la siguiente reacción, descrita como una *disociación*.




Una molécula que es capaz de liberar (donar) un ion de hidrógeno se denomina **ácido**. El protón liberado por la molécula de ácido acético en la reacción previa no permanece en estado libre; en cambio, se combina con otra molécula. Las posibles reacciones que involucran un protón incluyen:

- Combinación con una molécula de agua para formar un ion hidronio ($H_3O^+$).

$$H^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+$$

- Combinación con un ion hidroxilo ($OH^-$) para formar una molécula de agua.

$$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$$

- Combinación con un grupo amino ($-NH_2$) en una proteína para formar una amina cargada.

$$H^+ + -NH_2 \rightarrow -NH_3^+$$

Cualquier molécula que sea capaz de aceptar un protón se define como una **base**. Los ácidos y las bases existen en pares o *parejas*. Cuando el ácido pierde un protón (como cuando el ácido acético abandona un ion de hidrógeno), se convierte en una base (en este caso, ion acetato), que se denomina *base conjugada* del ácido. Del mismo modo, cuando una base (como un grupo $-NH_2$) acepta un protón, forma un ácido (en este caso $-NH_3^+$), que se denomina el *ácido conjugado* de esa base. Por tanto, el ácido siempre contiene una carga positiva más que su base conjugada. El agua es un ejemplo de una molécula *anfótera*, es decir, una que puede servir tanto como un ácido como una base:

$$\underset{\text{Ácido}}{H_3O^+} \rightleftharpoons H^+ + \underset{\text{Molécula anfótera}}{H_2O} \rightleftharpoons \underset{\text{Molécula base}}{OH^-} + H^+$$

Discutiremos otro grupo importante de moléculas anfóteras, los aminoácidos, en la página 49.

Los ácidos varían notablemente en la facilidad con la que abandonan un protón. Cuanto más fácil se pierde el protón, es decir, cuanto menos fuerte es la atracción de una base conjugada para su protón, más fuerte es el ácido. El cloruro de hidrógeno es un ácido muy fuerte, que transferirá fácilmente su protón a las moléculas de agua. La base conjugada de un ácido fuerte, como HCl, es una base débil (tabla 2-1). El ácido acético, por el contrario, es un ácido relativamente débil porque en su mayor parte permanece sin disociarse cuando se disuelve en agua. En cierto sentido, uno puede considerar el grado de disociación de un áci-

**TABLA 2-1 Fortalezas de ácidos y bases**

| Ácidos | | Bases | |
|---|---|---|---|
| Muy débil | $H_2O$ | $OH^-$ | Fuerte |
| Débiles | $NH_4^+$ | $NH_3$ | Débiles |
| | $H_2S$ | $S^{2-}$ | |
| | $CH_3COOH$ | $CH_3COO^-$ | |
| | $H_2CO_3$ | $HCO_3^-$ | |
| Fuerte | $H_3O^+$ | $H_2O$ | Muy débil |
| | $HCl$ | $Cl^-$ | |
| | $H_2SO_4$ | $SO_4^{2-}$ | |

do en términos de la competencia por protones entre los componentes de una solución. El agua es un mejor competidor, es decir, una base más fuerte que el ion cloruro, por lo que el HCl se disocia por completo. Por el contrario, el ion acetato es una base más fuerte que el agua, por lo que permanece en gran parte como ácido acético no disociado.

La acidez de una solución se mide por la concentración de iones de hidrógeno[4] y se expresa en términos de **pH,**

$$pH = -\log[H^+]$$

donde $[H^+]$ es la concentración molar de protones. Por ejemplo, una solución que tiene un pH de 5 contiene una concentración de iones de hidrógeno de $10^{-5}$ M. Debido a que la escala de pH es logarítmica, un aumento de una unidad de pH corresponde a una disminución 10 veces mayor en la concentración de $H^+$ (o un aumento 10 veces mayor en la concentración de $OH^-$). El jugo estomacal (pH 1.8), por ejemplo, tiene casi un millón de veces la concentración de $H^+$ en sangre (pH 7.4).

Una molécula de agua puede disociarse en un ion hidroxilo y un protón, $H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$. En agua pura, la concentración de ambos $H^+$ y $OH^-$ es de aproximadamente $10^{-7}$ M. El agua pura tiene un pH de 7.0 y desde que vemos el agua como el solvente estándar en el que se disuelven otras moléculas, es común referirse al pH 7 como "neutro".

La mayoría de los procesos biológicos son muy sensibles al pH porque los cambios en la concentración de iones de hidrógeno afectan el estado iónico de las moléculas biológicas. Por ejemplo, a medida que aumenta la concentración de iones de hidrógeno, el grupo $-NH_2$ del aminoácido arginina se capta protones para formar $-NH_3^+$, lo que puede interrumpir la actividad de la proteína completa. Incluso pequeños cambios en el pH pueden impedir las reacciones biológicas. Los organismos y las células que comprenden están protegidos de las fluctuaciones de pH por los **tampones**, compuestos que reaccionan con hidrógeno libre o iones de hidroxilo, resistiendo así los cambios en el pH. Las soluciones tampón usualmente contienen un ácido débil junto con su base conjugada. La sangre, por ejemplo, está tamponada por ácido carbónico y iones de bicarbonato, que normalmente tienen un pH sanguíneo de alrededor de 7.4.

$$\underset{\text{Ion de bicarbonato}}{HCO_3^-} + \underset{\text{Ion de hidrógeno}}{H^+} \rightleftharpoons \underset{\text{Ácido carbónico}}{H_2CO_3}$$

Si la concentración de iones de hidrógeno aumenta (como ocurre durante el ejercicio), los iones de bicarbonato se combinan con el exceso de protones, eliminándolos de la solución. Por el contrario, el exceso de iones $OH^-$ (que se generan durante la hiperventilación) se neutraliza por protones derivados de ácido carbónico. El pH del fluido dentro de la célula está regulado de manera similar por un sistema de tampón de fosfato que consiste en $H_2PO_4^-$ y $HPO_4^{2-}$.

[4] En soluciones acuosas, los protones no existen en el estado libre, sino más bien como $H_3O^+$ o $H_5O_2^+$. En aras de la simplicidad, nos referiremos a ellos simplemente como protones o iones de hidrógeno.

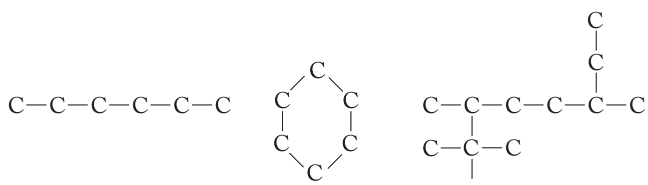
**REPASO**

1. Si tuviera que agregar ácido clorhídrico al agua, ¿qué efecto tendría esto en la concentración de iones de hidrógeno, o en el pH, o sobre la carga iónica de cualquier proteína en solución?
2. ¿Cuál es la relación entre una base y su ácido conjugado?

## 2.5 La naturaleza de las moléculas biológicas

La mayor parte de un organismo es agua. Si el agua se evapora, la mayor parte del peso seco restante consiste en moléculas que contienen átomos de carbono. Cuando se descubrieron por primera vez, se pensaba que las moléculas que contenían carbono estaban presentes solo en los organismos vivos y, por tanto, se les denominaba *moléculas orgánicas* para distinguirlas de las *moléculas inorgánicas* que se encuentran en el mundo inanimado. A medida que los químicos aprendieron a sintetizar más y más de estas moléculas que contienen carbono en el laboratorio, la mística asociada con los compuestos orgánicos desapareció. Los compuestos producidos por organismos vivos se llaman **bioquímicos**.

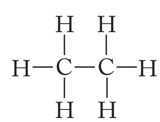
La química de la vida se centra en la química del átomo de carbono. La calidad esencial del carbono que le ha permitido desempeñar este papel es la increíble cantidad de moléculas que puede formar. Al tener cuatro electrones de capa externa, un átomo de carbono puede unirse con hasta cuatro átomos más. Lo que es más importante, cada átomo de carbono puede unirse con otros átomos de carbono para construir moléculas con cadenas principales que contienen largas cadenas de átomos de carbono. Las cadenas principales que contienen carbono pueden ser lineales, ramificadas o cíclicas.



Lineal　　Cíclico　　Ramificado

El colesterol, cuya estructura se representa en la **FIGURA 2-9**, ilustra varias disposiciones de átomos de carbono.

Tanto el tamaño como la estructura electrónica del carbono lo hacen especialmente adecuado para generar grandes cantidades de moléculas, de las cuales se conocen varios cientos de miles. Por el contrario, el silicio, que está justo debajo del carbono en la tabla periódica y también tiene cuatro electrones de capa externa (véase figura 2-1), es demasiado grande para que su núcleo con carga positiva atraiga los electrones de la capa exterior de los átomos vecinos con fuerza suficiente para mantener unidas esas grandes moléculas. Podemos comprender mejor la naturaleza de las moléculas biológicas comenzando con el grupo más simple de moléculas orgánicas, los *hidrocarburos*, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. La molécula etano ($C_2H_6$) es un hidrocarburo simple



Etano

que consta de dos átomos de carbono en el que cada carbono está unido al otro carbono así como a tres átomos de hidrógeno. A medida que se agregan más carbonos, los esqueletos de las moléculas orgánicas aumentan de longitud y su estructura se vuelve más compleja.

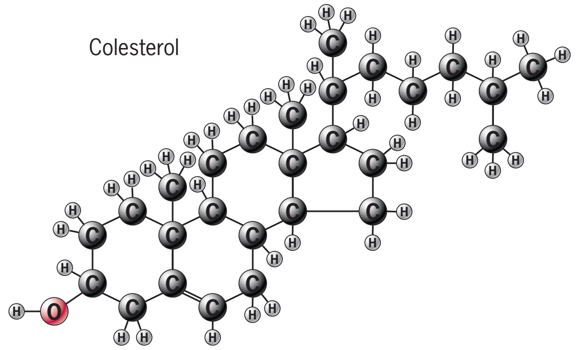
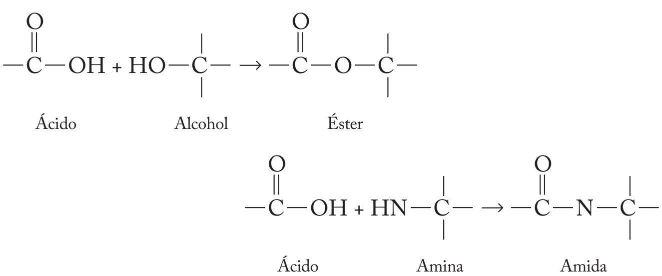



**FIGURA 2-9 Colesterol,** cuya estructura ilustra cómo los átomos de carbono (representados por las círculos negros) pueden formar enlaces covalentes con hasta cuatro átomos de carbono. Como resultado, los átomos de carbono se pueden unir entre sí para formar los esqueletos de una variedad prácticamente ilimitada de moléculas orgánicas. La cadena principal de carbono de una molécula de colesterol incluye cuatro anillos, que es característico de los esteroides (por ejemplo, estrógeno, testosterona, cortisol). La molécula de colesterol que se muestra aquí se dibuja como un modelo de esferas y barras, que es otra forma en la cual se representa la estructura molecular.

## Grupos funcionales

Los hidrocarburos no se producen en cantidades significativas en la mayoría de las células vivas (aunque constituyen la mayor parte de los combustibles fósiles formados a partir de los restos de plantas y animales antiguos). Muchas de las moléculas orgánicas que son importantes en biología contienen cadenas de átomos de carbono, como los hidrocarburos, pero ciertos átomos de hidrógeno son reemplazados por varios **grupos funcionales**. Los grupos funcionales son agrupaciones particulares de átomos que a menudo se comportan como una unidad y dan a las moléculas orgánicas sus propiedades físicas, reactividad química y solubilidad en solución acuosa. Algunos de los grupos funcionales más comunes se enumeran en la tabla 2-2. Dos de los enlaces más comunes entre los grupos funcionales son los **enlaces éster**, que se forman entre los ácidos carboxílicos y los alcoholes, y los **enlaces amida**, que se forman entre los ácidos carboxílicos y las aminas.




La mayoría de los grupos en la tabla 2.2 contienen uno o más átomos electronegativos (N, P, O y/o S) y hacen que las moléculas orgánicas sean más polares, más solubles en agua y más reactivas. Varios de estos grupos funcionales pueden ionizarse y cargarse positiva o negativamente. El efecto sobre las moléculas mediante la sustitución de diversos grupos funcionales se demuestra fácilmente. El hidrocarburo etano ($CH_3CH_3$) representado en la página 39 es un gas tóxico e inflamable. Si se reemplaza uno de los hidrógenos con un grupo hidroxilo (—OH) y la molécula ($CH_3CH_2OH$) se vuelve grato al paladar es alcohol etílico (o etanol). Si se sustituye un grupo carboxilo (—COOH) y la molécula se convierte en ácido acético ($CH_3COOH$), el ingrediente de fuerte sabor del vinagre. Si se sustituye un grupo sulfhidrilo (—SH) se formará $CH_3CH_2SH$, un agente fuerte y maloliente, etil mercaptano, utilizado por los bioquímicos en el estudio de reacciones enzimáticas.

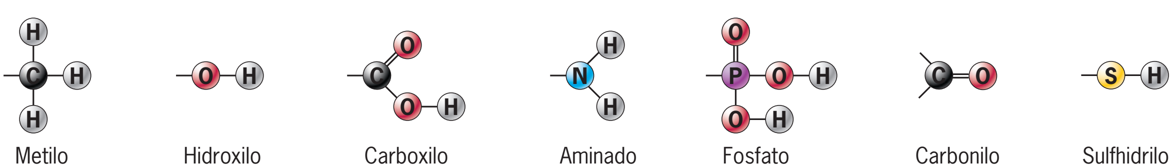
## Una clasificación de moléculas biológicas por función

Las moléculas orgánicas que se encuentran comúnmente en las células vivas se pueden dividir en varias categorías según su función en el metabolismo.

1. ***Macromoléculas.*** Las moléculas que forman la estructura y llevan a cabo las actividades de las células son moléculas enormes y altamente organizadas llamadas **macromoléculas**, que contienen de docenas a millones de átomos de carbono. Debido a su tamaño y a las formas intrincadas que pueden asumir las macromoléculas, algunos de estos gigantes moleculares pueden realizar tareas complejas con gran precisión y eficiencia. La presencia de macromoléculas, más que cualquier otra característica, dota a los organismos de las propiedades de la vida y los separa químicamente del mundo inanimado.

   Las macromoléculas se pueden dividir en cuatro categorías principales: proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y ciertos lípidos. Los tres primeros tipos son *polímeros* compuestos de un gran número de bloques de construcción de bajo peso molecular o *monómeros*. Estas macromoléculas están construidas a partir de monómeros mediante un proceso de *polimerización* que se asemeja a la unión de vagones de ferrocarril en un tren (**FIGURA 2-10**). La estructura básica y la función de cada tipo de macromolécula son similares en todos los organismos. No es hasta que se observan las secuencias específicas de los monómeros que componen las macromoléculas individuales que se hace evidente la diversidad entre los organismos. La localización de estas moléculas en varias estructuras celulares se muestra en una visión general en la **FIGURA 2-11**.
2. ***Los bloques de construcción de las macromoléculas.*** La mayoría de las macromoléculas dentro de una célula tienen una vida útil corta en comparación con la propia célula; con la excepción del DNA de la célula, estos se degradan continuamente y son reemplazados por nuevas macromoléculas. En consecuencia, la mayoría de las células contienen un suministro (o *conjunto*) de precursores de bajo peso molecular que están listos para incorporarse en las macromoléculas. Estos incluyen azúcares, que son los precursores de polisacáridos; aminoácidos, que son los precursores de las proteínas; nucleótidos, que son los precursores de ácidos nucleicos, y ácidos grasos, que se incorporan a los lípidos.

**TABLA 2-2 Grupos funcionales**



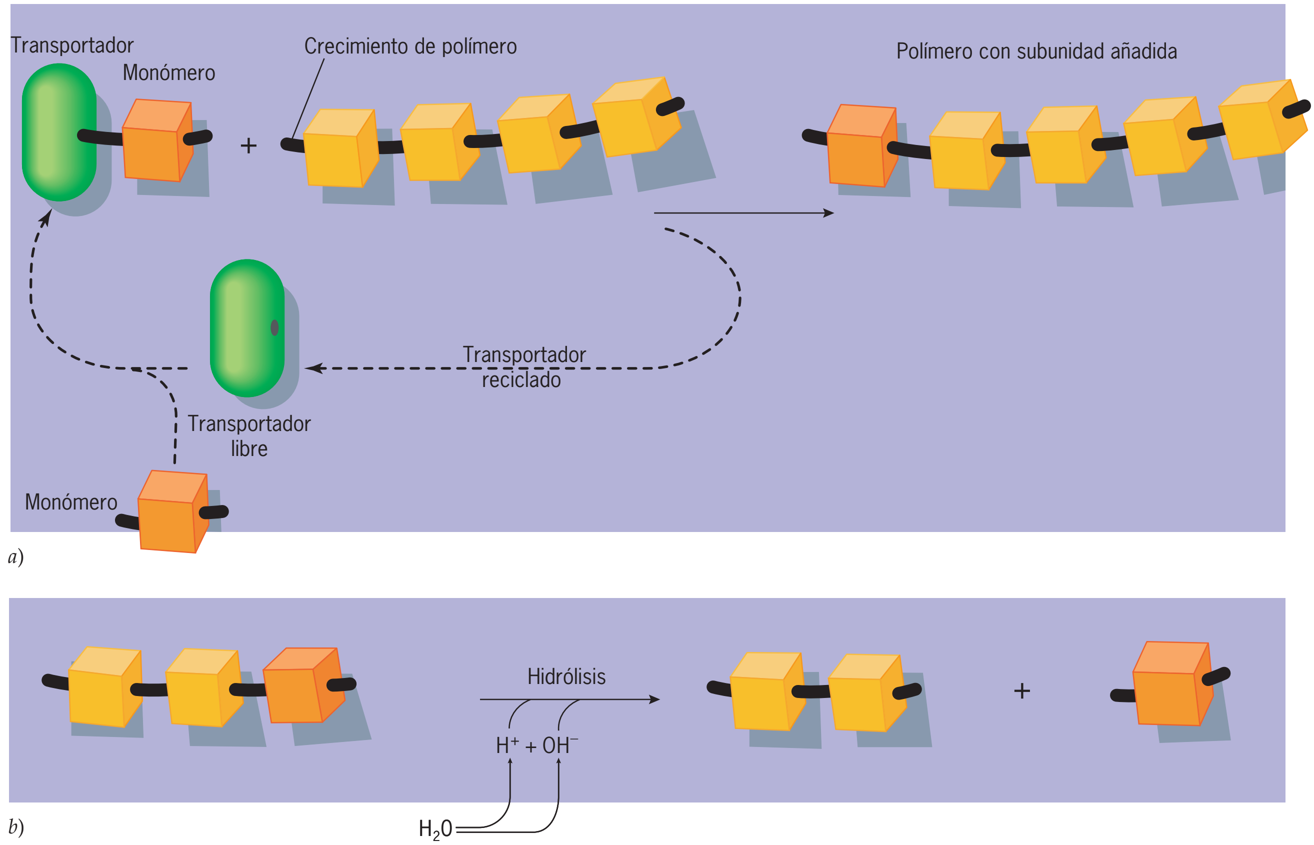



**FIGURA 2-10 Monómeros y polímeros; polimerización e hidrólisis.** *a*) Los polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos consisten en monómeros (subunidades) unidos por enlaces covalentes. Los monómeros libres simplemente no reaccionan entre sí para convertirse en macromoléculas. Por el contrario, cada monómero se activa primero mediante la unión a una molécula transportadora que ayuda al monómero a reaccionar químicamente con el extremo de la macromolécula en crecimiento. *b*) Una macromolécula se desmonta por hidrólisis de los enlaces que unen los monómeros. La hidrólisis es la división de un enlace por agua. Todas estas reacciones son catalizadas por enzimas específicas.

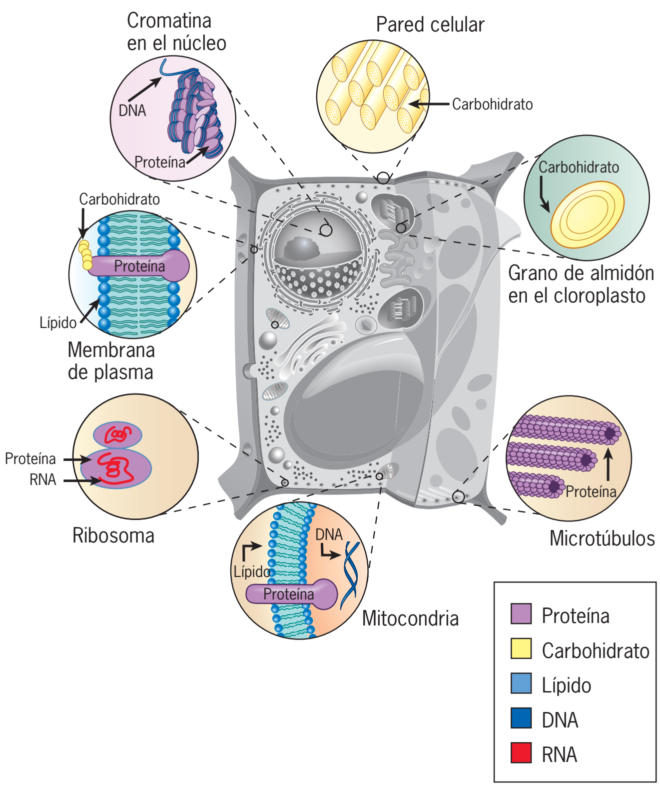



**FIGURA 2-11** Una visión general de los tipos de moléculas biológicas que componen varias estructuras celulares.

3. ***Intermediarios metabólicos (metabolitos).*** Las moléculas en una célula tienen estructuras químicas complejas y deben sintetizarse en una secuencia paso a paso que comienza con materiales de partida específicos. En la célula, cada serie de reacciones químicas se denomina **vía metabólica**. La célula comienza con el compuesto A y lo convierte en el compuesto B, luego en el compuesto C, y así sucesivamente, hasta que se produce algún producto final funcional (como un bloque de construcción de aminoácidos de una proteína). Los compuestos formados a lo largo de las vías que conducen a los productos finales pueden no tener función *per se* y se denominan **intermedios metabólicos**.
4. ***Moléculas de diversas funciones.*** Obviamente esta es una amplia categoría de moléculas, pero no tan grande como se podría esperar; el grueso del peso seco de una célula está formado por macromoléculas y sus precursores directos. Las moléculas de diversas funciones incluyen sustancias como vitaminas, que funcionan principalmente como adyuvantes de las proteínas; ciertas hormonas esteroides o de aminoácidos; moléculas involucradas en el almacenamiento de energía, como ATP; moléculas reguladoras como el monofosfato de adenosina (AMP, *monophosphate adenosine*) cíclico, y productos de desecho metabólicos como la urea.

## REPASO

1. ¿Qué propiedades de un átomo de carbono son importantes para la vida?
2. Dibuja las estructuras de cuatro grupos funcionales diferentes. ¿Cómo alteraría cada uno de estos grupos la solubilidad de una molécula en el agua?

## 2.6 Carbohidratos



Los **carbohidratos** (o **glucanos**, como se les llama a menudo) incluyen azúcares simples (o *monosacáridos*) y todas las moléculas más grandes construidas con bloques de azúcar. Los carbohidratos funcionan principalmente como depósitos de energía química y como materiales de construcción duraderos para la construcción biológica. La mayoría de los azúcares tienen la fórmula general $(CH_2O)_n$. Los azúcares de importancia en el metabolismo celular tienen valores de *n* que van de 3 a 7. Los azúcares que contienen tres carbonos se conocen como *triosas*, los que tienen cuatro carbonos como *tetrosas*, los que tienen cinco carbonos como *pentosas*, los que tienen seis carbonos como *hexosas* y aquellos con siete carbonos como *heptosas*.

### La estructura de azúcares simples

Cada molécula de azúcar consiste en una columna central de átomos de carbono unidos entre sí en una serie lineal por enlaces simples. Cada uno de los átomos de carbono de la cadena principal está unido a un único grupo hidroxilo, a excepción de uno que porta un grupo *carbonilo* (C═O). Si el grupo carbonilo está ubicado en una posición interna (para formar un grupo cetona), el azúcar es una *cetosa*, como la fructosa, que se muestra en la **FIGURA 2-12*a*)**. Si el carbonilo se encuentra en un extremo del azúcar, forma un grupo aldehído y la molécula se conoce como *aldosa*, como se ejemplifica con la glucosa, que se muestra en la figura 2-12*b-f*). Debido a su gran cantidad de grupos hidroxilo, los azúcares tienden a ser altamente solubles en agua.

Aunque las fórmulas de cadena recta que se muestran en la figura 2-12*a,b*) son útiles para comparar las estructuras de varios azúcares, los azúcares que tienen cinco o más carbonos reaccionan espontáneamente (figura 2-12*c*) para producir una molécula cerrada o que contiene un anillo. Solo una pequeña fracción de las moléculas de azúcar en solución se encuentran en la forma lineal de cadena abierta; el resto está en forma de anillo. La forma lineal es bioquímicamente importante porque el grupo aldehído al final de la cadena es reactivo y puede reaccionar con las proteínas, especialmente con la hemoglobina. Los pacientes con diabetes tienen niveles más altos de azúcar en la sangre y este azúcar en su forma de cadena abierta reacciona con la hemoglobina para producir una hemoglobina modificada llamada hemoglobina A1c, que a menudo se usa en análisis de sangre para rastrear el progreso de la diabetes. Reacciones similares de azúcar en forma lineal con proteínas involucradas en el metabolismo del colesterol son una de las razones por las que la diabetes causa enfermedades cardiacas. La forma de cadena abierta de los azúcares es, por tanto, muy importante en medicina, pero la gran mayoría de los azúcares se encuentran en forma de anillo, y es en esta forma que se usan como bloques de construcción para construir otros tipos de carbohidratos. Las formas de anillo de los azúcares generalmente se representan como estructuras *planas* (figura 2-12*d*) que se encuentran perpendiculares al plano del papel con la línea engrosada situada más cerca del lector. Los grupos H y OH se encuentran paralelos al plano del papel, sobresaliendo por encima o por debajo del anillo del azúcar. De hecho, el anillo de azúcar no es una estructura plana, sino que generalmente existe en una conformación tridimensional que se asemeja a una silla (figura 2-12*e,f*).

### Estereoisomerismo

Como se señaló anteriormente, un átomo de carbono puede unirse con otros cuatro átomos. La disposición de los grupos alrededor de un átomo de carbono se puede representar como en la **FIGURA 2-13*a*)** con el carbono colocado en el centro de un tetraedro y los grupos unidos proyectados en sus cuatro esquinas. La figura 2-13*b*) representa una molécula de gliceraldehído, que es la única aldotriosa. El segundo átomo de carbono del gliceraldehído está ligado a cuatro grupos diferentes (–H, –OH, –CHO y $–CH_2OH$). Si los cuatro grupos unidos a un átomo de carbono son todos diferentes, como en el gliceraldehído, existen dos configuraciones posibles que no pueden superponerse entre sí. Estas dos moléculas (denominadas *estereoisómeros* o *enantiómeros*) tienen esencialmente las mismas reactividades químicas, pero sus estructuras son imágenes de espejo (no como un par de manos humanas derecha e izquierda). Por convención, la molécula se llama D-gliceraldehído si el grupo hidroxilo del carbono 2 se proyecta hacia la derecha, y el L-gliceraldehído si se proyecta hacia la izquierda (figura 2-13*c*). Debido a que actúa como un sitio de estereoisomerismo, el carbono 2 se denomina átomo de carbono *asimétrico*.

A medida que la columna central de las moléculas de azúcar aumenta en longitud, también lo hace el número de átomos de carbono asimétricos y, en consecuencia, el número de estereoisómeros. Las aldotetrosas tienen dos carbonos asimétricos y, por tanto, pueden existir en cuatro configuraciones diferentes (**FIGURA**

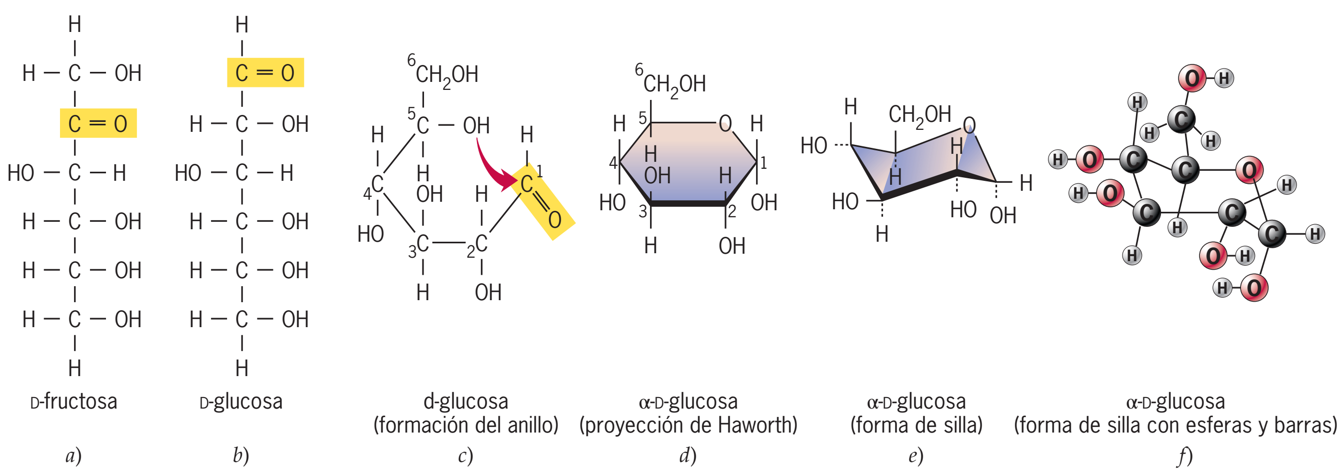



**FIGURA 2-12 Las estructuras de azúcares.** *a*) Fórmula de cadena recta de fructosa, una cetohexosa [ceto, que indica que el carbonilo (amarillo), se localiza internamente, y la hexosa porque consta de seis carbonos]. *b*) Fórmula de cadena recta de glucosa, una aldohexosa (aldo porque el carbonilo está ubicado al final de la molécula). *c*) Reacción espontánea en la que la glucosa se convierte de una cadena abierta a un anillo cerrado (un anillo de piranosa). *d*) La glucosa se representa comúnmente en forma de un anillo plano (planar) que se encuentra perpendicular a la página con la línea engrosada situada más cerca del lector y los grupos H y OH que sobresalen por encima o por debajo del anillo. La base para la designación α-D-glucosa se trata en la siguiente sección. *e*) La conformación de la silla de la glucosa, que representa su estructura tridimensional con mayor precisión que el anillo plano de la parte *d*. *f*) Un modelo de esferas y barras de la conformación en silla de la glucosa.

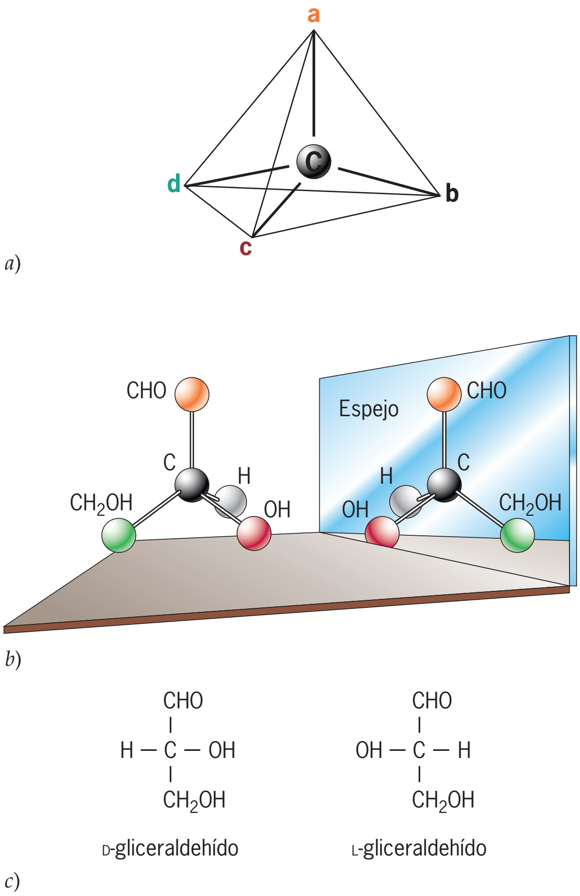



**FIGURA 2-13 Estereoisomerismo del gliceraldehído.** *a*) Los cuatro grupos unidos a un átomo de carbono (etiquetados como *a*, *b*, *c* y *d*) ocupan las cuatro esquinas de un tetraedro con el átomo de carbono en su centro. b) El gliceraldehído es la única aldosa de tres carbonos; su segundo átomo de carbono está unido a cuatro grupos diferentes (—H, —OH, —CHO y —$CH_2OH$). Como resultado, el gliceraldehído puede existir en dos configuraciones posibles que no son superponibles, sino que son imágenes especulares entre sí, como se indica. Estos dos estereoisómeros (o enantiómeros) pueden distinguirse por la configuración de los cuatro grupos alrededor del átomo de carbono asimétrico (o *quiral*). Las soluciones de estos dos isómeros rotan la luz polarizada en el plano en direcciones opuestas y, por tanto, se dice que son ópticamente activas. *c*) Fórmulas de cadena lineal de gliceraldehído. Por convención, el isómero D se muestra con el grupo OH a la derecha.

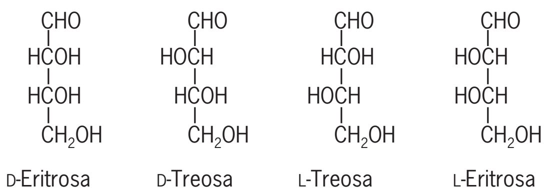



**FIGURA 2-14 Aldotetrosas.** Debido a que tienen dos átomos de carbono asimétricos, las aldotetrosas pueden existir en cuatro configuraciones.

**2-14**). Del mismo modo, hay ocho aldopentosas diferentes y 16 aldohexosas diferentes. La designación de cada uno de estos azúcares como D o L se basa en la convención sobre la disposición de grupos unidos al átomo de carbono asimétrico más alejado del aldehído (el carbono asociado con el aldehído se designa C1). Si el grupo hidroxilo de este carbono se proyecta hacia la derecha, la aldosa es un D-azúcar; si se proyecta hacia la izquierda, es un L-azúcar. Las enzimas presentes en las células vivas pueden distinguir entre las formas D y L de un azúcar. Típicamente, solo uno de los estereoisómeros (como D-glucosa y L-fucosa) es utilizado por las células.

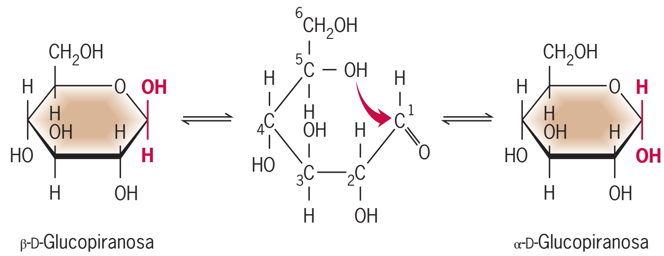



**FIGURA 2-15 Formación de una α- y β-piranosa.** Cuando una molécula de glucosa experimenta autorreacción para formar un anillo de piranosa (es decir, un anillo de seis miembros), se generan dos estereoisómeros. Los dos isómeros están en equilibrio entre sí a través de la forma de cadena abierta de la molécula. Por convención, la molécula es una α-piranosa cuando el grupo OH del primer carbono se proyecta debajo del plano del anillo, y una β-piranosa cuando el grupo hidroxilo se proyecta hacia arriba.

La reacción espontánea en la que una molécula de glucosa de cadena lineal se convierte en un anillo de seis miembros (*piranosa*) se muestra en la figura 2-12*c*). A diferencia de su precursor en la cadena abierta, el C1 del anillo tiene cuatro grupos diferentes y, por tanto, se convierte en un nuevo centro de asimetría dentro de la molécula de azúcar. Debido a este átomo de carbono extra asimétrico, cada tipo de piranosa existe como estereoisómeros α y β (**FIGURA 2-15**). Por convención, la molécula es una α-piranosa cuando el grupo OH del primer átomo de carbono se proyecta debajo del plano del anillo, y una β-piranosa cuando el hidroxilo se proyecta hacia arriba. La diferencia entre las dos formas tiene importantes consecuencias biológicas, que resultan, por ejemplo, en la forma compacta de las moléculas de glucógeno y almidón y la conformación extendida de la celulosa (discutida más adelante).

## Unión de los azúcares

Los azúcares se pueden unir entre sí mediante **enlaces glucosídicos** covalentes para formar moléculas más grandes. Los enlaces glucosídicos se forman por reacción entre el átomo de carbono C1 de un azúcar y el grupo hidroxilo de otro azúcar, generando un enlace –C–O–C entre los dos azúcares. Como se analiza a continuación (y se indica en las **FIGURAS 2-16** y **2-17**), los azúcares se pueden unir mediante una gran variedad de enlaces glucosídicos

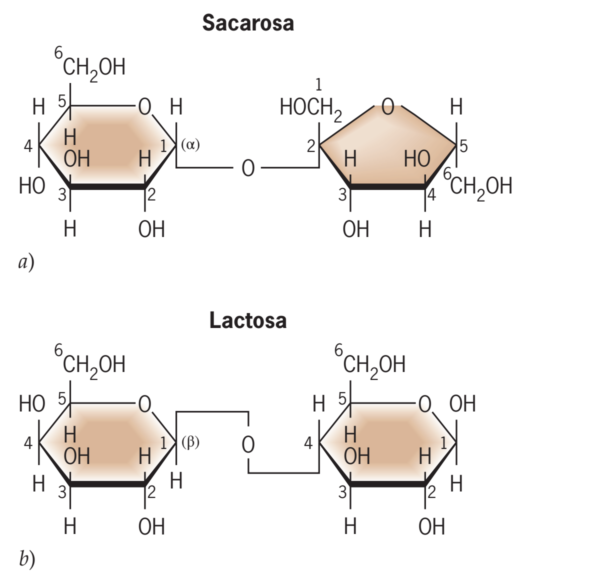



**FIGURA 2-16 Disacáridos.** La sacarosa y la lactosa son dos de los disacáridos más comunes. La sacarosa se compone de glucosa y fructosa unidas por un enlace α (1⟶2), mientras que la lactosa se compone de glucosa y galactosa unidas por un enlace β (1⟶4)

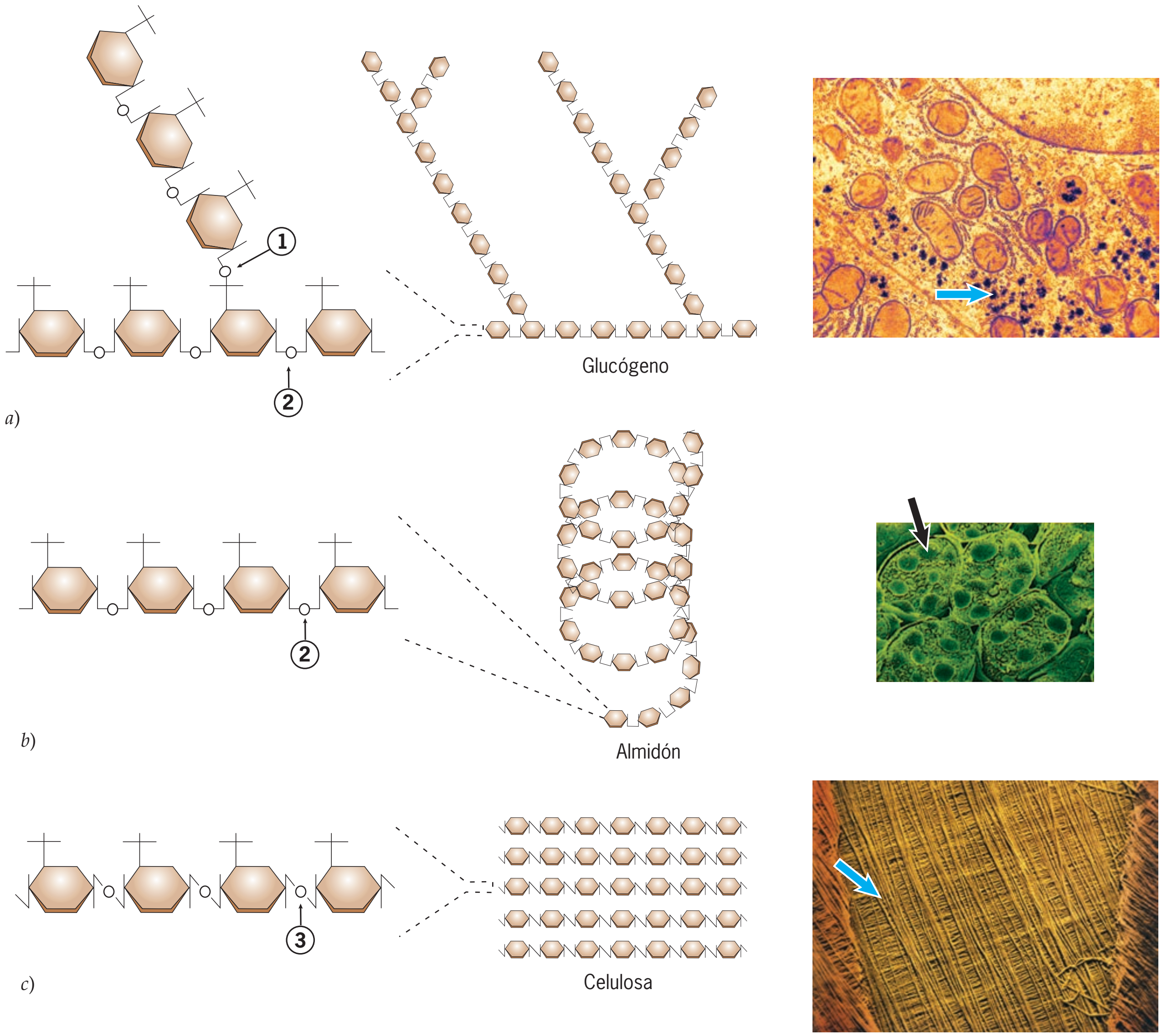



**FIGURA 2-17 Tres polisacáridos con monómeros de azúcares idénticos pero propiedades radicalmente diferentes.** El glucógeno *a*), el almidón *b*) y la celulosa *c*) están compuestos enteramente de subunidades de glucosa, pero sus propiedades químicas y físicas son muy diferentes debido a las distintas formas en que los monómeros están unidos (tres tipos diferentes de enlaces son indicados por los números en un círculo). Las moléculas de glucógeno son las más ramificadas, las moléculas de almidón suponen una disposición helicoidal, y las moléculas de celulosa no están ramificadas y están muy extendidas. Mientras que el glucógeno y el almidón son reservas de energía, las moléculas de celulosa se agrupan en fibras duras adecuadas para su función estructural. Las micrografías electrónicas coloreadas muestran gránulos de glucógeno en una célula hepática, granos de almidón (amiloplastos) en una semilla de planta y fibras de celulosa en la pared celular de una planta; cada uno está indicado por una flecha.

FUENTE: *a*) Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.; *b*) Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc.; *c*) Biophoto Associates Photo Researchers, Inc.

diferentes. Las moléculas compuestas de solo dos unidades de azúcar son *disacáridos* (figura 2-16). Los disacáridos sirven principalmente como reservas de energía de fácil acceso. La sacarosa, o azúcar de mesa, es un componente principal de la savia de la planta, que transporta energía química de una parte de la planta a otra. La lactosa, presente en la leche de la mayoría de los mamíferos, suministra a los mamíferos recién nacidos combustible para el crecimiento y desarrollo temprano. La lactosa en la dieta es hidrolizada por la enzima lactasa, que está presente en las membranas plasmáticas de las células que recubren el intestino. Muchas personas pierden esta enzima después de la infancia y descubren que comer productos lácteos causa molestias digestivas.

Los azúcares también se pueden unir para formar pequeñas cadenas llamadas **oligosacáridos** (*oligo* = poco). Con mucha frecuencia, tales cadenas se encuentran covalentemente unidas a lípidos y proteínas, convirtiéndolas en glucolípidos y glucoproteínas, respectivamente. Los oligosacáridos son particularmente importantes en los glucolípidos y glucoproteínas de la membrana plasmática, donde se proyectan desde la superficie de la célula (véase figura 4.4*a*). Debido a que los oligosacáridos pueden estar compuestos por muchas combinaciones diferentes de unidades de azúcar, estos carbohidratos pueden desempeñar un papel informativo; es decir, pueden servir para distinguir un tipo de célula de otro y ayudar a mediar interacciones específicas de una célula con su entorno.

## Polisacáridos

A mediados del siglo XIX, se sabía que la sangre de las personas que padecían diabetes tenía un sabor dulce debido a un nivel elevado de glucosa, el azúcar clave en el metabolismo energético. Claude Bernard, un prominente fisiólogo francés de la época, estaba buscando la causa de la diabetes investigando la fuente de azúcar en la sangre. Se supuso en ese momento que cualquier azúcar presente en un ser humano o un animal tenía que haberse consumido previamente en la dieta. Trabajando con perros,

Bernard descubrió que, incluso si los animales se colocaban en una dieta totalmente carente de carbohidratos, su sangre aún contenía una cantidad normal de glucosa. Claramente, la glucosa podría formarse en el cuerpo a partir de otros tipos de compuestos.

Después de más investigaciones, Bernard descubrió que la glucosa ingresa a la sangre a través del hígado. Él descubrió que el tejido hepático contiene un polímero insoluble de glucosa que llamó **glucógeno**. Bernard concluyó que varios materiales alimenticios (como proteínas) se llevaban al hígado, donde se convertían químicamente en glucosa y se almacenaban como glucógeno. Luego, como el cuerpo necesitaba azúcar como combustible, el glucógeno del hígado se transformó en glucosa, que se liberó al torrente sanguíneo para satisfacer los tejidos sin glucosa. En la hipótesis de Bernard, el equilibrio entre la formación de glucógeno y la degradación del glucógeno en el hígado fue el principal determinante para mantener el nivel relativamente constante (*homeostático*) de glucosa en la sangre.

La hipótesis de Bernard resultó ser correcta. La molécula que denominó glucógeno es un tipo de **polisacárido**, un polímero de unidades de azúcar unidas por enlaces glucosídicos.

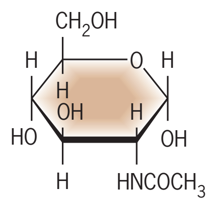
**GLUCÓGENO Y ALMIDÓN: POLISACÁRIDOS NUTRICIONALES.** El glucógeno es un polímero ramificado que contiene solo un tipo de monómero: glucosa (figura 2-17*a*). La mayoría de las unidades de azúcar de una molécula de glucógeno se unen entre sí por enlaces glucosídicos $\alpha(1 \rightarrow 4)$ (enlace tipo 2 en la figura 2-17*a*). Los puntos de ramificación contienen un azúcar unido a tres unidades vecinas en lugar de a dos, como en los segmentos no ramificados del polímero. El vecino adicional, que forma la rama, está unido por un enlace glucosídico $\alpha(1 \rightarrow 6)$ (enlace tipo 1 en la figura 2-17*a*).

El glucógeno sirve como almacén de excedentes de energía química en la mayoría de los animales. Los músculos esqueléticos humanos, por ejemplo, típicamente contienen suficiente glucógeno para alimentar alrededor de 30 minutos de actividad moderada. Dependiendo de varios factores, el glucógeno típicamente varía en peso molecular de aproximadamente uno a cuatro millones de dalton. Cuando se almacena en las células, el glucógeno está altamente concentrado en lo que parecen ser gránulos irregulares y con tinción oscura en las micrografías electrónicas (figura 2-17*a*), derecha).

La mayoría de las plantas depositan su excedente de energía química en forma de **almidón**, que al igual que el glucógeno es también un polímero de glucosa. Las papas y los cereales, por ejemplo, consisten principalmente en almidón. El almidón es en realidad una mezcla de dos polímeros diferentes, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula helicoidal no ramificada cuyos azúcares están unidos por enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$ (figura 2-17*b*), mientras que la amilopectina es ramificada. La amilopectina difiere del glucógeno por ser mucho menos ramificada y tener un patrón de ramificación irregular. El almidón se almacena como gránulos densamente empaquetados, o *granos de almidón*, que están encerrados en organelos unidos a la membrana (*plástidos*) dentro de la célula de la planta [figura 2-17*b*), derecha]. Aunque los animales no sintetizan el almidón, poseen una enzima (*amilasa*) que lo hidroliza fácilmente.

**CELULOSA, QUITINA Y GLUCOSAMINOGLUCANOS: POLISACÁRIDOS ESTRUCTURALES.** Considerando que algunos polisacáridos constituyen depósitos de energía fácilmente digeribles, otros forman materiales estructurales resistentes y duraderos. El algodón y el lino, por ejemplo, consisten principalmente en **celulosa**, que es el componente principal de las paredes celulares de las plantas. Las telas de algodón deben su durabilidad a las moléculas de celulosa largas, no ramificadas, que se ordenan en agregados uno al lado del otro para formar cables moleculares [figura 2-17*c*), panel derecho] que están construidos idealmente para resistir las fuerzas de tracción (o tensión). Al igual que el glucógeno y el almidón, la celulosa consiste únicamente en monómeros de glucosa; sus propiedades difieren drásticamente de estos otros polisacáridos porque las unidades de glucosa están unidas por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ (enlace 3 en la figura 2-17*c*) en lugar de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Irónicamente, los animales multicelulares (con raras excepciones) carecen de la enzima necesaria para degradar la celulosa, que resulta ser la materia orgánica más abundante en la Tierra y rica en energía química. Los animales que "sobreviven" al digerir la celulosa, como las termitas y las ovejas, lo hacen al albergar bacterias y protozoos que sintetizan la enzima necesaria, la celulasa. La celulosa es un componente importante de la *fibra dietética*, un término amplio que incluye todos los polisacáridos que comemos que no pueden ser digeridos por las enzimas humanas.

No todos los polisacáridos biológicos consisten en monómeros de glucosa. La *quitina* es un polímero no ramificado del azúcar N-acetilglucosamina, que es similar en estructura a la glucosa pero tiene un grupo acetil amino en lugar de un grupo hidroxilo unido al segundo átomo de carbono del anillo.




*N*-acetilglucosamina

La quitina se presenta ampliamente como material estructural entre los invertebrados, particularmente en la cubierta exterior de insectos, arañas y crustáceos. La quitina es un material resistente, elástico y flexible, a diferencia de ciertos plásticos. Los insectos deben gran parte de su éxito a este polisacárido altamente adaptativo (**FIGURA 2-18**).

Otro grupo de polisacáridos que tiene una estructura más compleja son los **glucosaminoglucanos** (o los **GAG**). A diferencia de otros polisacáridos, tienen la estructura —A—B—A—B—,

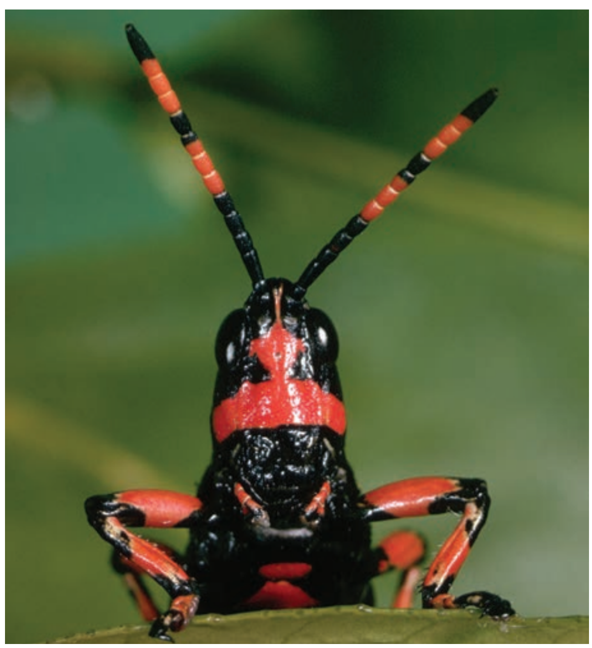


**FIGURA 2-18 La quitina es el componente principal del esqueleto externo de este saltamontes.**

FUENTE: Anthony Bannister/Gallo Images/© Corbis.

donde A y B representan dos azúcares diferentes. El GAG mejor estudiado es la heparina, que es secretada por las células en los pulmones y otros tejidos en respuesta a la lesión tisular. La heparina inhibe la coagulación de la sangre, evitando así la formación de coágulos que pueden bloquear el flujo de sangre al corazón o los pulmones. La heparina logra esta hazaña al activar un inhibidor (antitrombina) de una enzima clave (trombina) que se requiere para la coagulación de la sangre. La heparina, que normalmente se extrae del tejido del cerdo, se ha usado durante décadas para prevenir los coágulos de sangre en pacientes después de una cirugía mayor. A diferencia de la heparina, la mayoría de los GAG se encuentran en los espacios que rodean a las células, y su estructura y función se analizan en la sección 7.3. Los polisacáridos más complejos se encuentran en las paredes celulares de las plantas (sección 7.14).

**REPASO**

1. Nombre tres polisacáridos compuestos de polímeros de glucosa. ¿Cómo se diferencian estas macromoléculas unas de otras?

## 2.7 Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de moléculas biológicas no polares cuyas propiedades comunes son su capacidad para disolverse en solventes orgánicos, como el cloroformo o el benceno, y su incapacidad para disolverse en el agua, una propiedad que explica muchas de sus variadas funciones biológicas. Los lípidos de importancia en la función celular incluyen grasas, esteroides y fosfolípidos.

### Grasas

Las **grasas** consisten en una molécula de glicerol unida por enlaces éster a tres ácidos grasos; la molécula compuesta se denomina **triacilglicerol** (**FIGURA 2-19*a***), también conocida como triglicérido. Comenzaremos considerando la estructura de los ácidos grasos. Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos largas, no ramificadas con un único grupo carboxilo en un extremo (figura 2-19*b*). Debido a que los dos extremos de una molécula de ácido graso tienen una estructura muy diferente, también tienen distintas propiedades. La cadena de hidrocarburo es hidrofóbica, mientras que el grupo carboxilo (—COOH), que tiene una carga negativa a pH fisiológico, es hidrofílico. Se dice que las moléculas que tienen ambas regiones hidrofóbica e hidrofílica son **anfipáticas**; tales moléculas tienen propiedades inusuales y biológicamente importantes. Las propiedades de los ácidos grasos se pueden apreciar considerando el uso de un producto familiar: el jabón, que consiste en ácidos grasos. En siglos pasados, los jabones se hacían calentando la grasa animal en un álcali fuerte (NaOH o KOH) para romper los enlaces entre los ácidos grasos y el glicerol. Hoy en día, la mayoría de los jabones se hacen sintéticamente. Los jabones deben su capacidad para disolver la grasa al hecho de que el extremo hidrofóbico de cada ácido graso puede incrustarse en la grasa, mientras que el extremo hidrofílico puede interactuar con el agua circundante. Como resultado, los materiales grasos se convierten en complejos (*micelas*) que se pueden dispersar con agua (**FIGURA 2-20**).

Los ácidos grasos difieren entre sí en la longitud de su cadena de hidrocarburos y la presencia o ausencia de dobles enlaces. Los ácidos grasos presentes en las células generalmente varían en longitud de 14 a 20 carbonos. Los ácidos grasos que carecen de dobles enlaces, como el ácido esteárico (figura 2-19*b*), se describen como **saturados**; aquellos que poseen dobles enlaces son **insaturados**. Los ácidos grasos naturales tienen dobles enlaces en la configuración *cis*. Los dobles enlaces (de la configuración *cis*)

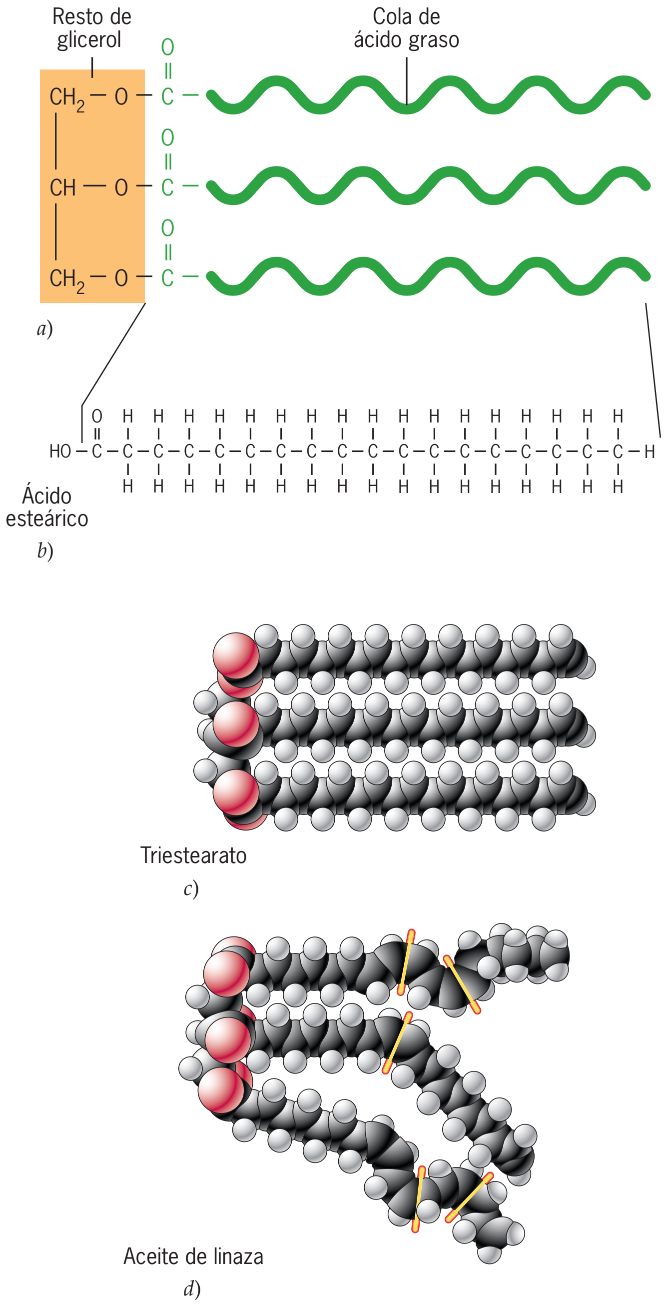
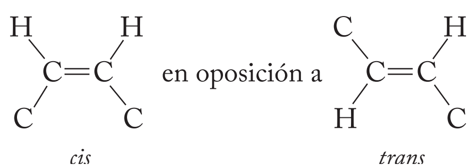



**FIGURA 2-19 Grasas y ácidos grasos.** *a*) La estructura básica de un triacilglicerol (también llamado triglicérido o una grasa neutra). El resto glicerol, indicado en naranja, está unido por tres enlaces éster a los grupos carboxilo de tres ácidos grasos cuyas colas están indicadas en verde. *b*) Ácido esteárico, un ácido graso saturado de 18 carbonos que es común en las grasas animales. *c*) Modelo de triestearato que rellena el espacio, un triacilglicerol que contiene tres cadenas idénticas de ácido esteárico. d) Modelo del volumen completo del aceite de linaza, un triacilglicerol derivado de semillas de lino que contiene tres ácidos grasos insaturados (ácidos linoleico, oleico y linolénico). Los sitios de insaturación, que producen dobleces en la molécula, están indicados por las barras amarillo-naranja.




producen dobleces en una cadena de ácido graso. En consecuencia, cuantos más enlaces dobles poseen las cadenas de ácidos grasos, menos eficazmente pueden encapsularse estas cadenas lar-

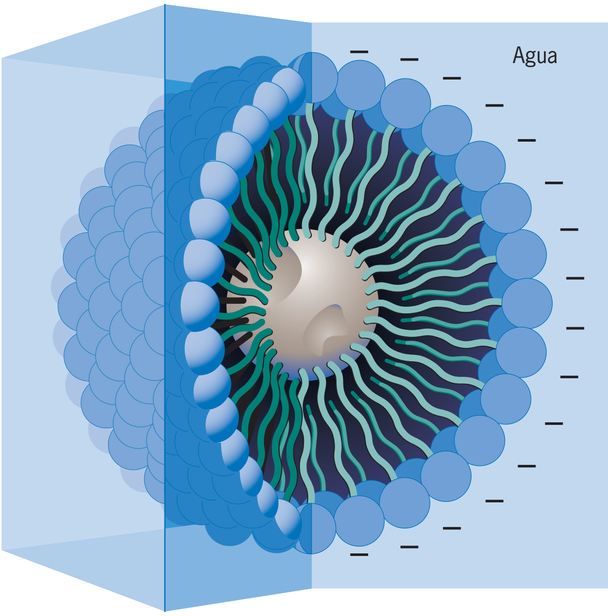



**FIGURA 2-20 Los jabones consisten en ácidos grasos.** En este dibujo esquemático de una micela de jabón, las colas no polares de los ácidos grasos se dirigen hacia adentro, donde interactúan con la materia grasa que se disolverá. Las cabezas cargadas negativamente se encuentran en la superficie de la micela, donde interactúan con el agua circundante. Las proteínas de membrana, que de igual forma tienden a ser insolubles en agua, también se pueden solubilizar de esta manera mediante la extracción de membranas con detergentes.

gas. Esto reduce la temperatura a la que se se licua un lípido que contiene ácidos grasos. El triestearato, cuyos ácidos grasos carecen de dobles enlaces (figura 2-19*c*), es un componente común de las grasas animales y permanece en estado sólido muy por encima de la temperatura ambiente. Por el contrario, la profusión de dobles enlaces en las grasas vegetales explica su estado líquido, tanto en la célula de la planta como en el estante del supermercado, y por ser etiquetados como “poliinsaturados”. Las grasas que son líquidas a temperatura ambiente se denominan **aceites**. La figura 2-19*d*) muestra la estructura del aceite de linaza, un lípido altamente volátil extraído de las semillas de lino, que permanece líquido a una temperatura mucho más baja que el triestearato. Las grasas sólidas, como la margarina, se forman a partir de aceites vegetales insaturados mediante la reducción química de los dobles enlaces con átomos de hidrógeno (un proceso denominado *hidrogenación*). El proceso de hidrogenación también convierte algunos de los dobles enlaces *cis* en dobles enlaces *trans*, que son rectos en lugar de torcidos. Este proceso genera grasas parcialmente hidrogenadas o *trans*. Comer grasas *trans* aumenta el riesgo de enfermedades del corazón, y las grasas *trans* artificiales ahora están prohibidas en varios países, con otras grasas se está considerando tomar medidas similares.

Una molécula de grasa puede contener tres ácidos grasos idénticos (como en la figura 2-19*c*), o puede ser una *grasa mixta*, que contiene más de una especie de ácido graso (como en la figura 2-19*d*). La mayoría de las grasas naturales, como el aceite de oliva o la grasa láctea, son mezclas de moléculas que tienen diferentes especies de ácidos grasos.

Las grasas son muy ricas en energía química; un gramo de grasa contiene más del doble del contenido de energía de un gramo de carbohidratos (por las razones discutidas en la sección 3.9). Los carbohidratos funcionan principalmente como una fuente de energía disponible a corto plazo, mientras que las reservas de grasa almacenan energía a largo plazo. Se estima que una persona de tamaño promedio contiene aproximadamente 0.5 kilogramos (kg) de carbohidratos, principalmente en forma de glucógeno. Esta cantidad de carbohidratos proporciona aproximadamente 2 000 kcal de energía total. Durante el curso de un ejercicio extenuante, una persona puede prácticamente agotar la reserva total de carbohidratos de su cuerpo. En contraste, la persona promedio contiene aproximadamente 16 kg de grasa (equivalente a 144 000 kcal de energía), y como todos sabemos, puede llevar mucho tiempo agotar nuestra reserva de este material.

Debido a que carecen de grupos polares, las grasas son extremadamente insolubles en agua y se almacenan en las células en forma de gotas de lípidos secos. Debido a que las gotas de lípidos no contienen agua como lo hacen los gránulos de glucógeno, representan un combustible de almacenamiento extremadamente concentrado. En muchos animales, las grasas se almacenan en células especiales (*adipocitos*) cuyo citoplasma está lleno de una o unas pocas gotas de lípidos grandes. Los adipocitos exhiben una capacidad notable de cambiar su volumen para acomodar cantidades variables de grasa.

## Esteroides

Los esteroides se construyen alrededor de un característico esqueleto de hidrocarburo de cuatro anillos. Uno de los esteroides más importantes es el *colesterol*, un componente de las membranas de las células animales y un precursor para la síntesis de varias hormonas esteroides, como la testosterona, la progesterona y el estrógeno (**FIGURA 2-21**). El colesterol está ausente en gran parte de las células vegetales, por lo que los aceites vegetales se consideran “libres de colesterol”, pero las células vegetales pueden contener grandes cantidades de compuestos relacionados.

## Fosfolípidos

La estructura química de un fosfolípido común se muestra en la **FIGURA 2-22**. La molécula se asemeja a una grasa (triacilglicerol), pero tiene solo dos cadenas de ácidos grasos en lugar de tres; es un *diacilglicerol*. El tercer hidroxilo de la cadena principal de glicerol se une covalentemente a un grupo fosfato, que a su vez se une covalentemente a un pequeño grupo polar, como la colina, como

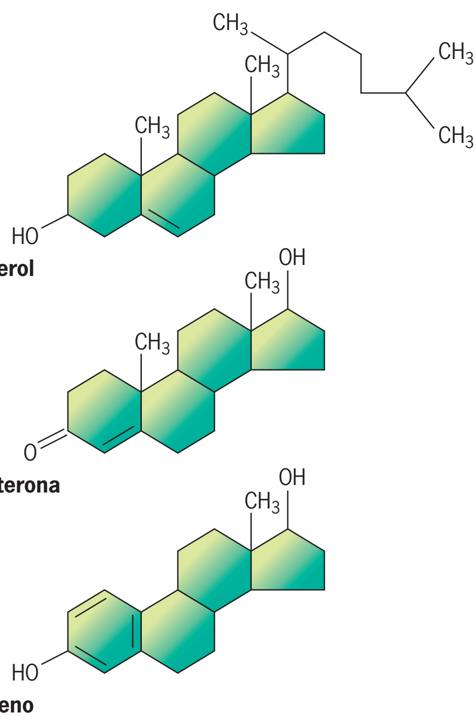



**FIGURA 2-21 La estructura de los esteroides.** Todos los esteroides comparten el esqueleto básico de cuatro anillos. Las diferencias aparentemente menores en la estructura química entre el colesterol, la testosterona y el estrógeno generan profundas diferencias biológicas.

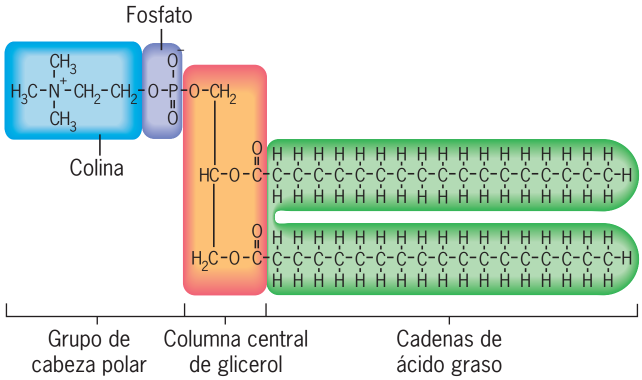



**FIGURA 2-22 El fosfolípido fosfatidilcolina.** La molécula consiste en una cadena principal de glicerol cuyos grupos hidroxilo están unidos covalentemente a dos ácidos grasos y a un grupo fosfato. El fosfato cargado negativamente también está unido a un pequeño grupo de colina con carga positiva. El extremo de la molécula que contiene la fosforilcolina es hidrofílico, mientras que el extremo opuesto, que consiste en la cola de ácido graso, es hidrofóbico. La estructura y función de fosfatidilcolina y otros fosfolípidos se discuten en detalle en la sección 4.2.

se muestra en la figura 2-22. Por tanto, a diferencia de las moléculas de grasa, los fosfolípidos contienen dos extremos que tienen propiedades muy diferentes: el extremo que contiene el grupo fosfato tiene un carácter claramente hidrofílico; el otro extremo compuesto por las dos colas de ácidos grasos tiene un carácter claramente hidrofóbico. Debido a que los fosfolípidos funcionan principalmente en las membranas celulares, y debido a que las propiedades de las membranas celulares dependen de sus componentes fosfolípidos, se discutirán más a fondo en las secciones 4.2 y 15.6 en conexión con las membranas celulares.

**REPASO**

1. Describe las propiedades de tres tipos diferentes de moléculas de lípidos. ¿Cuáles son sus respectivos roles biológicos?

## 2.8 Bloques de construcción de proteínas

Las proteínas son las macromoléculas que llevan a cabo prácticamente todas las actividades de una célula; son las herramientas moleculares y las máquinas que hacen que las cosas sucedan. Como enzimas, las proteínas aceleran enormemente la tasa de



**FIGURA 2-23 Cuatro ejemplos de las miles de estructuras biológicas compuestas predominantemente de proteínas.** Estos incluyen *a*) plumas, que son adaptaciones en aves para aislamiento térmico, vuelo y reconocimiento de sexo; y *b*) telarañas, hechas de una seda a base de proteínas que se encuentra entre los materiales más fuertes conocidos; *c*) cabello humano, compuesto por la proteína queratina, y *d*) uñas de las manos, que también están compuestos de queratina.

FUENTE: *a*) Darrell Gulin/Getty Images, Inc.; *b*) © gabriela schaufelberger/iStockphoto; *c*) © Science Picture Co.; *d*) Tamara 83/Shutterstock.

reacciones metabólicas; como cables estructurales, las proteínas proporcionan soporte mecánico tanto dentro de las células como fuera de sus perímetros (**FIGURA 2-23*a***); como hormonas, factores de crecimiento y activadores de genes, las proteínas realizan una amplia variedad de funciones reguladoras; como receptores de membrana y transportadores, las proteínas determinan a qué reacciona una célula y qué tipos de sustancias entran o salen de la célula; como filamentos contráctiles y motores moleculares, las proteínas constituyen la maquinaria para los movimientos biológicos. Entre sus muchas otras funciones, las proteínas actúan como anticuerpos, sirven como toxinas, forman coágulos de sangre, absorben o refractan la luz (figura 2-23*b*) y transportan sustancias de una parte del cuerpo a otra.

¿Cómo puede un tipo de molécula tener tantas funciones variadas? La explicación reside en las estructuras moleculares virtualmente ilimitadas que las proteínas, *como grupo*, pueden asumir. Cada proteína, sin embargo, tiene una estructura única y definida que le permite llevar a cabo una función particular. Lo más importante es que las proteínas tienen formas y superficies que les permiten interactuar *selectivamente* con otras moléculas. Las proteínas, en otras palabras, exhiben un alto grado de especificidad. Es posible, por ejemplo, que una enzima de un corte de DNA particular reconozca un segmento de DNA que contiene una secuencia específica de ocho nucleótidos, mientras que ignora todas las otras 65 535 secuencias posibles compuestas por este número de nucleótidos.

## Las estructuras de los aminoácidos

Las proteínas son polímeros hechos de monómeros de aminoácidos. Cada proteína tiene una secuencia única de aminoácidos que le da a la molécula sus propiedades únicas. Muchas de las capacidades de una proteína pueden entenderse examinando las propiedades químicas de sus aminoácidos constituyentes. Veinte aminoácidos diferentes se utilizan comúnmente en la construcción de proteínas, ya sea de un virus o un ser humano. Hay que considerar dos aspectos de la estructura de los aminoácidos: el que es común a todos ellos y el que es único para cada uno. Comenzaremos con las propiedades compartidas.

Todos los aminoácidos tienen un grupo carboxilo y un grupo amino, que están separados entre sí por un único átomo de carbono, el carbono α (**FIGURA 2-24*a*, *b***). En una solución acuosa neutra, el grupo α-carboxilo pierde su protón y existe en un estado cargado negativamente ($-COO^-$), y el grupo α-amino acepta un protón y existe en un estado de carga positiva ($NH_3^+$) (figura 2-24*b*). Vimos en la página 43 que los átomos de carbono unidos a cuatro grupos diferentes pueden existir en dos configuraciones (*estereoisómeros*) que no pueden superponerse entre sí. Los aminoácidos también tienen átomos de carbono asimétricos. Con la excepción de la glicina, el carbono α de los aminoácidos se une a cuatro grupos diferentes, de modo que cada aminoácido puede existir en forma de D o de L (**FIGURA 2-25**). Los aminoácidos utilizados en la síntesis de una proteína en un ribosoma son siempre L-aminoácidos. La "selección" de L-aminoácidos debe haber ocurrido muy temprano en la evolución celular y se ha conservado durante miles de millones de años. Los microorganismos, sin embargo, usan D-aminoácidos en la síntesis de ciertos péptidos pequeños, que incluyen los de la pared celular y varios antibióticos (p. ej., gramicidina A).

Durante el proceso de síntesis de proteínas, cada aminoácido se une a otros dos aminoácidos, formando un polímero largo, continuo y no ramificado llamado **cadena polipeptídica**. Los aminoácidos que componen una cadena polipeptídica se unen mediante **enlaces peptídicos** que resultan de la unión del grupo carboxilo de un aminoácido al grupo amino de su vecino, con la eliminación de una molécula de agua (figura 2-24*c*). Una cadena polipeptídica compuesta de una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos tiene la siguiente estructura:

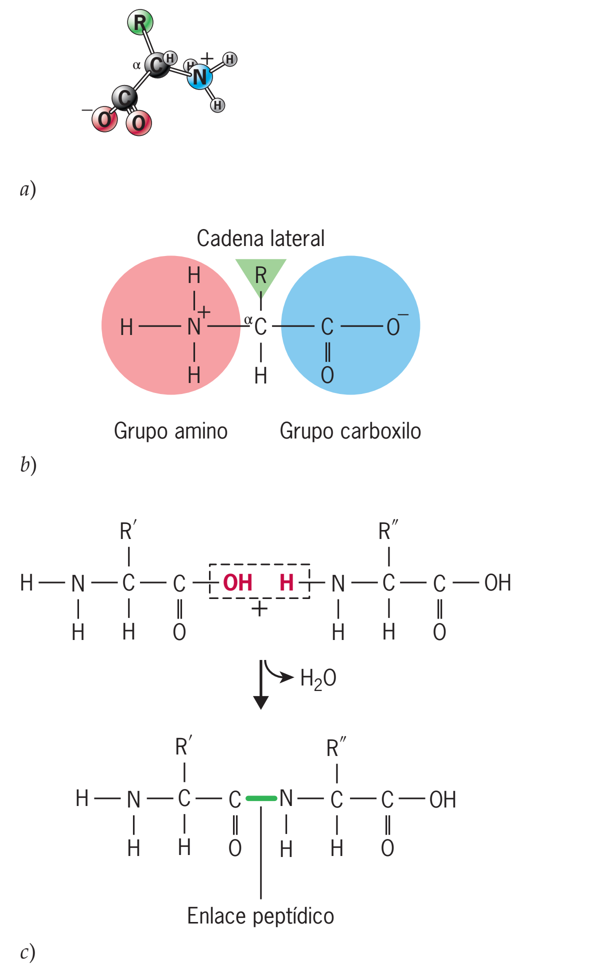



**FIGURA 2-24 Estructura de los aminoácidos.** Modelo de esferas y barras *a*) y fórmula química *b*) de un aminoácido generalizado en el que R puede ser cualquiera de una serie de grupos químicos (véase la figura 2-26). *c*) La formación de un enlace peptídico ocurre por la condensación de dos aminoácidos, dibujados aquí en el estado no cargado. En la célula, esta reacción se produce en un ribosoma cuando un aminoácido se transfiere de un transportador (una molécula de tRNA) al extremo de la cadena polipeptídica en crecimiento (véase la figura 11-49).

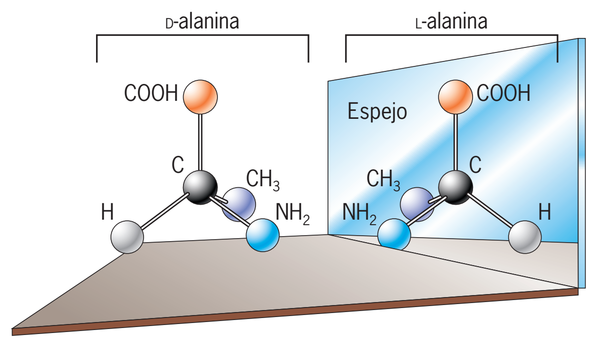
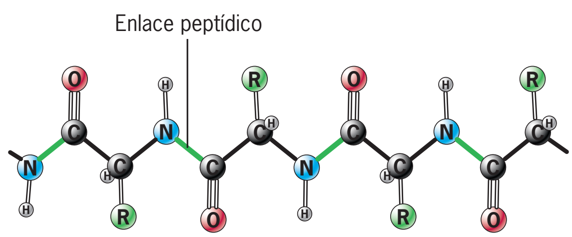



**FIGURA 2-25 Estereoisomerismo de los aminoácidos.** Debido a que el carbono *α* de todos los aminoácidos excepto la glicina está unido a cuatro grupos diferentes, pueden existir dos estereoisómeros. Se muestran las formas D y L de la alanina.



La cadena polipeptídica "promedio" contiene aproximadamente 450 aminoácidos. El polipéptido más largo conocido, que se encuentra en la proteína muscular titina, contiene más de 30 000 aminoácidos. Una vez incorporados en una cadena polipeptídica, los aminoácidos se denominan *residuos*. El residuo en un extremo de la cadena, el *N-terminal*, contiene un aminoácido con un grupo α-amino libre (no unido), mientras que el residuo en el extremo opuesto, el *C-terminal*, tiene un grupo α-carboxilo libre. Además de los aminoácidos, muchas proteínas contienen otros tipos de componentes que se agregan después de que se sintetiza el polipéptido. Estos incluyen carbohidratos (para formar glucoproteínas), grupos que contienen metales (para formar metaloproteínas) y grupos orgánicos (p. ej., flavoproteínas).

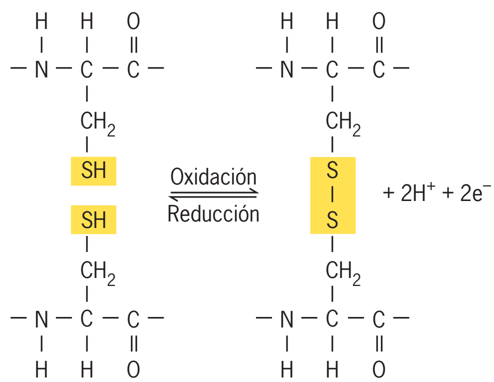
## Las propiedades de las cadenas laterales

El esqueleto, o cadena principal, de un polipéptido está compuesta por la parte de cada aminoácido que es común a todos ellos. La **cadena lateral** o **grupo R** (figura 2-24), unida al carbono α, es muy variable entre los 20 bloques de construcción, y es esta variabilidad la que finalmente les da a las proteínas sus diversas estructuras y actividades. Si las diversas cadenas laterales de aminoácidos se consideran juntas, exhiben una gran variedad de características estructurales, que van desde completamente cargadas a hidrofóbicas, y pueden participar en una amplia variedad de enlaces covalentes y no covalentes. Como se analiza en el siguiente capítulo, las cadenas laterales de los "sitios activos" de las enzimas pueden facilitar (catalizar) muchas reacciones orgánicas diferentes. Las características variadas de las cadenas laterales de los aminoácidos son importantes en ambas interacciones *intra*moleculares, ya que determinan la estructura y la actividad de la molécula, y las interacciones *inter*moleculares, las cuales determinan la relación de un polipéptido con otras moléculas, incluidos otros polipéptidos (p. 60).

Los aminoácidos se clasifican en el carácter de sus cadenas laterales. Se dividen aproximadamente en cuatro categorías: polares y cargados, polares y no cargados, no polares y aquellos con propiedades únicas (**FIGURA 2-26**).

1. ***Polar, con carga*** (figura 2-26*a*). Los aminoácidos de este grupo incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina. Estos cuatro aminoácidos contienen cadenas laterales que se cargan por completo; es decir, las cadenas laterales contienen ácidos y bases orgánicos relativamente fuertes. Las reacciones de ionización del ácido glutámico y la lisina se muestran en la **FIGURA 2-27**. A pH fisiológico, las cadenas laterales de estos aminoácidos casi siempre están presentes en el estado de carga completa. En consecuencia, son capaces de formar enlaces iónicos con otras especies cargadas en la célula. Por ejemplo, los residuos de arginina cargados positivamente de las proteínas histónicas están unidos por enlaces iónicos a los grupos fosfato cargados negativamente de DNA (véase figura 2-3). La histidina también se considera un aminoácido polar cargado, aunque en la mayoría de los casos solo está parcialmente cargado a pH fisiológico. De hecho, debido a su capacidad para ganar o perder un protón en rangos de pH fisiológicos, la histidina es un residuo particularmente importante en el sitio activo de muchas proteínas (como en la figura 3-13).
2. ***Polar, sin carga*** (figura 2-26*b*). Las cadenas laterales de estos aminoácidos tienen una carga negativa o positiva parcial y, por tanto, pueden formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas, incluido el agua. Estos aminoácidos son a menudo bastante reactivos. Se incluyen en esta categoría la asparagina y la glutamina (las amidas del ácido aspártico y el ácido glutámico), la treonina, la serina y la tirosina.
3. ***No polar*** (figura 2-26*c*). Las cadenas laterales de estos aminoácidos son hidrofóbicas y no pueden formar enlaces electrostáticos o interactuar con el agua. Los aminoácidos de esta categoría son alanina, valina, leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y metionina. Las cadenas laterales de los aminoácidos no polares generalmente carecen de oxígeno y nitrógeno. Varían principalmente en tamaño y forma, lo que permite que una u otra de ellas se agrupen estrechamente en un espacio particular dentro del núcleo de una proteína, asociándose entre sí como resultado de las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas.
4. ***Los otros tres aminoácidos*:** glicina, prolina y cisteína (figura 2-26*d*), tienen propiedades únicas que los separan de los demás. La cadena lateral de la glicina consiste solo en un átomo de hidrógeno, y la glicina es un aminoácido muy importante por esta razón. Debido a la falta de una cadena lateral, los residuos de glicina proporcionan un sitio donde las cadenas principales de dos polipéptidos (o dos segmentos del mismo polipéptido) se pueden aproximar entre sí muy de cerca. Además, la glicina es más flexible que otros aminoácidos y permite que partes de la columna central se muevan o formen una bisagra. La prolina es única en tener su grupo α-amino como parte de un anillo (convirtiéndolo en un iminoácido). La prolina es un aminoácido hidrofóbico que no encaja fácilmente en una estructura secundaria ordenada, como una hélice α (p. 54), que a menudo produce dobleces o bisagras. La cisteína contiene un grupo sulfhidrilo reactivo (—SH) y a menudo está unido covalentemente a otro residuo de cisteína, como un **puente disulfuro** (—SS—).

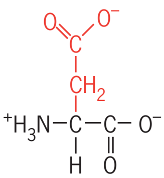
**Cisteína**

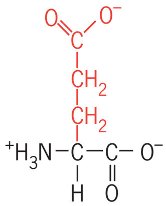


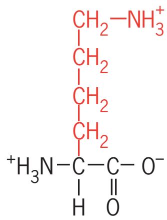

Los puentes disulfuro a menudo se forman entre dos cisteínas que están distantes entre sí en la cadena principal del polipéptido o incluso en dos polipéptidos separados. Los puentes disulfuro ayudan a estabilizar las formas intrincadas de las proteínas, particularmente aquellas presentes fuera de las células donde están sujetas a un estrés físico y químico añadido. Por ejemplo, el pelo está hecho de una gran cantidad de filamentos compuestos por la queratina proteica rica en cisteína, entrecruzada por puentes disulfuro. Cuando alguien se hace una "ondulación permanente" para que el cabello se riegue, el peluquero coloca el pelo en rulos y luego agrega un agente reductor que rompe los puentes disulfuro, dejando que los filamentos de queratina se deslicen unos sobre otros. Cuando el agente reductor se elimina por lavado, los puentes disulfuro se vuelven a formar, bloqueando la queratina en las nuevas posiciones y haciendo que el cabello permanezca bloqueado permanentemente en la forma impartida por los rulos. El mismo principio se usa en los tratamientos de aclarado del cabello, excepto que en este caso los pelos se extraen directamente antes de aplicar el agente reductor.

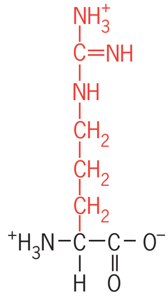
No todos los aminoácidos descritos en esta sección se encuentran en todas las proteínas, ni los diversos aminoácidos se distribuyen de manera equivalente. También se encuentran otros aminoácidos en las proteínas, pero surgen por alteraciones en las cadenas laterales de los 20 aminoácidos básicos después de su incorporación en una cadena polipeptídica. Por esta razón, se llaman **modificaciones postraduccionales** (**PTM**). Se han documentado docenas de diferentes tipos de PTM. La PTM más exten-

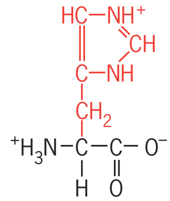
**Polar con carga**


Ácido aspártico
(Asp o D)


Ácido glutámico
(Glu o E)


Lisina
(Lys o K)

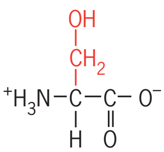

Arginina
(Arg o R)

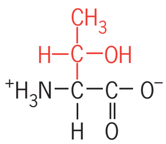

Histidina
(His o H)

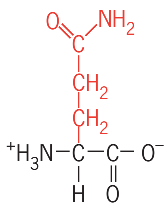
Propiedades de las cadenas laterales (grupos R):

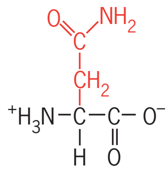
Las cadenas laterales hidrofílicas actúan como ácidos o bases que tienden a estar completamente cargadas (+ o –) en condiciones fisiológicas
Las cadenas laterales forman enlaces iónicos y a menudo participan en reacciones químicas.

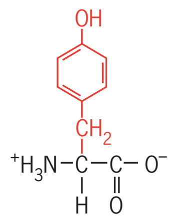
**Polar sin carga**


Serina
(Ser o S)


Treonina
(Thr o T)


Glutamina
(Gln o Q)

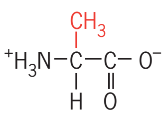

Asparagina
(Asn o N)

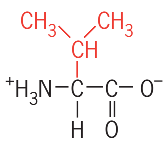

Tirosina
(Tyr o Y)

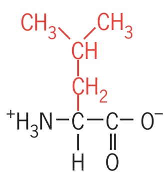
Propiedades de las cadenas laterales:

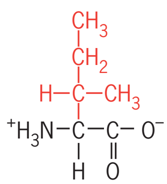
Las cadenas laterales hidrofílicas tienden a tener carga parcial + o – lo que les permite participar en reacciones químicas, formar enlaces H y asociarse con el agua.

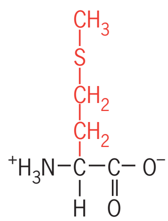
**No polar**

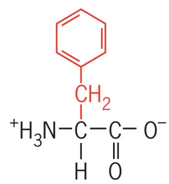

Alanina
(Ala o A)

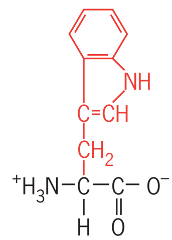

Valine
(Val o V)


Leucina
(Leu o L)


Isoleucina
(Ile o I)


Metionina
(Met o M)

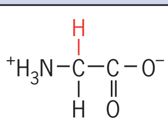

Fenilalanina
(Phe o F)

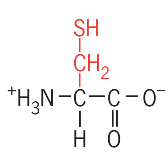

Triptófano
(Trp o W)

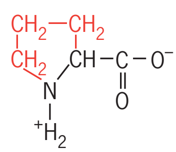
Propiedades de las cadenas laterales:

La cadena lateral hidrofóbica consiste casi por completo en átomos de C y H. Estos aminoácidos tienden a formar el núcleo interno de proteínas solubles, enterradas lejos del medio acuoso. Desempeñan un papel importante en las membranas al asociarse con la bicapa lipídica.

**Cadenas laterales con propiedades únicas**


Glicina
(Gly o G)


Cisteína
(Cys o C)

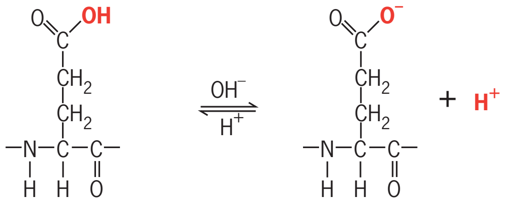

Prolina
(Pro o P)

La cadena lateral consiste únicamente en un átomo de hidrógeno y puede caber en un entorno hidrofílico o hidrofóbico. La glicina a menudo reside en sitios donde dos polipéptidos entran en contacto directo.

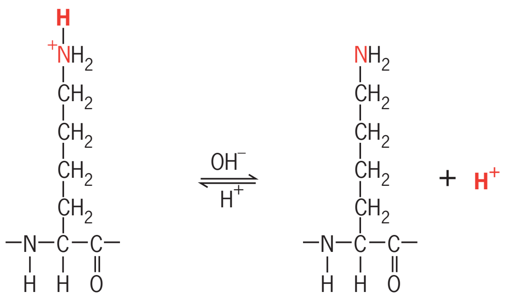
Aunque la cadena lateral tiene carácter polar, no cargada, tiene la propiedad única de formar un enlace covalente con otra cisteína para formar un enlace disulfuro.

Aunque la cadena lateral tiene carácter hidrofóbico, tiene la propiedad única de crear dobleces en cadenas de polipéptidos e interrumpir la estructura secundaria ordenada.

**FIGURA 2-26 La estructura química de los aminoácidos.** Estos 20 aminoácidos representan los más comúnmente encontrados en proteínas y, más específicamente, aquellos codificados por DNA. Otros aminoácidos se producen como resultado de una modificación a uno de los que se muestran aquí. Los aminoácidos se organizan en cuatro grupos según el carácter de sus cadenas laterales, como se describe en el texto. Todas las moléculas se representan como aminoácidos libres en su estado ionizado ya que existirían en solución a pH neutro.




*a*)

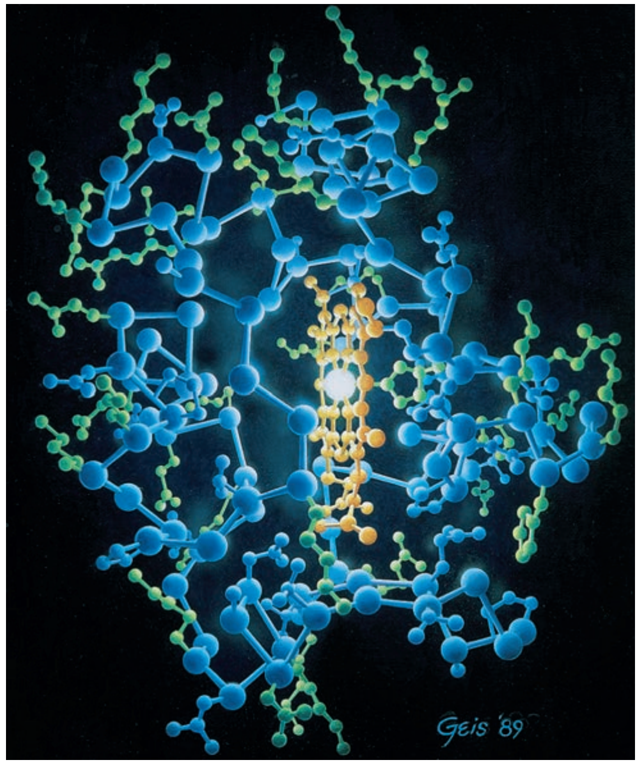



*b*)

**FIGURA 2-27 La ionización de aminoácidos polares cargados.** *a*) La cadena lateral del ácido glutámico pierde un protón cuando su grupo ácido carboxílico se ioniza. El grado de ionización del grupo carboxilo depende del pH del medio: cuanto mayor es la concentración de iones hidrógeno (menor es el pH), menor es el porcentaje de grupos carboxilo que están presentes en el estado ionizado. Por el contrario, un aumento en el pH conduce a una mayor ionización del protón del grupo carboxilo, aumentando el porcentaje de cadenas laterales de ácido glutámico cargadas negativamente. El pH al que el 50% de las cadenas laterales están ionizadas y el 50% están sindicalizadas se denomina pK, que es 4.4 para la cadena lateral de ácido glutámico libre. A pH fisiológico, prácticamente todos los residuos de ácido glutámico de un polipéptido están cargados negativamente. *b*) El lado la cadena de lisina se ioniza cuando su grupo amino gana un protón. Cuanto mayor es la concentración de iones hidroxilo (mayor es el pH), menor es el porcentaje de grupos amino que tienen carga positiva. El pH al que se cargan el 50% de las cadenas laterales de lisina y el 50% no está cargado es 10.0, que es el pK de la cadena lateral de lisina libre. A pH fisiológico, prácticamente todos los residuos de lisina de un polipéptido están cargados positivamente. Una vez incorporado en un polipéptido, el pK de un grupo cargado puede verse muy influenciado por el entorno circundante.

dida e importante es la adición reversible de un grupo fosfato a un residuo de serina, treonina o tirosina. La acetilación de lisina es otra PTM extendida e importante que afecta a miles de proteínas en una célula de mamífero. Las PTM pueden generar cambios drásticos en las propiedades y función de una proteína, sobre todo modificando su estructura tridimensional, nivel de actividad, localización dentro de la célula, vida útil y/o sus interacciones con otras moléculas. La presencia o ausencia de un único grupo fosfato en una proteína reguladora clave tiene el potencial de determinar si una célula se comportará como una célula cancerosa o una célula normal. Debido a las PTM, un único polipéptido puede existir como un número de moléculas biológicas distintas.

El carácter iónico, polar o no polar de las cadenas laterales de aminoácidos es muy importante en la estructura y función de la proteína. La mayoría de las proteínas solubles (es decir, no membranosas) se construyen de modo que los residuos polares se sitúen en la superficie de la molécula, donde pueden asociarse con el agua circundante y contribuir a la solubilidad de la proteína en solución acuosa (**FIGURA 2-28*a***). Por el contrario, los residuos no polares se encuentran predominantemente en el núcleo de la molécula (figura 2-28*b*). Los residuos hidrofóbicos del interior de la proteína a menudo se agrupan apretadamente, creando un tipo de rompecabezas tridimensional en el que generalmente se excluyen las moléculas de agua. Las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales no polares de estos residuos son una fuerza




*a*)




*b*)

**FIGURA 2-28 Disposición de residuos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la proteína soluble citocromo c.** *a*) Las cadenas laterales hidrófilas, que se muestran en verde, se localizan principalmente en la superficie de la proteína donde entran en contacto con el medio acuoso circundante. *b*) Los residuos hidrofóbicos, que se muestran en rojo, se encuentran principalmente en el centro de la proteína, particularmente en las proximidades del grupo hem central.

FUENTE: Ilustración, Irving Geis. Imagen de la Colección Irving Geis/Instituto Médico Howard Hughes. Derechos propiedad de HHMI. Reproducida con autorización.

motriz durante el plegamiento de proteínas (p. 61) y contribuyen sustancialmente a la estabilidad general de la proteína. En muchas enzimas, los grupos polares reactivos se proyectan hacia el interior no polar, dando a la proteína su actividad catalítica. Por ejemplo, un entorno no polar puede mejorar las interacciones iónicas entre los grupos cargados que se verían disminuidas por la competencia con el agua en un entorno acuoso. Algunas reacciones que pueden ocurrir a una velocidad imperceptiblemente lenta en el agua pueden ocurrir en millonésimas de segundo dentro de la proteína.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son las principales propiedades que distinguen a los diferentes aminoácidos entre sí? ¿Qué papeles desempeñan estas diferencias en la estructura y función de las proteínas?
2. ¿Cuáles son las propiedades de la glicina, la prolina y la cisteína que distinguen estos aminoácidos?

## 2.9 Estructuras primarias y secundarias de las proteínas

En ninguna parte de la biología se ilustra mejor la relación íntima entre forma y función que con las proteínas. La estructura de la mayoría de las proteínas está completamente definida y es predecible. Cada aminoácido en una de estas macromoléculas gigantes se encuentra en un sitio específico dentro de la estructura, dando a la proteína la forma precisa y la reactividad requeridas para el trabajo en cuestión. La estructura de la proteína se puede describir en varios niveles de organización, cada uno enfatizando un aspecto diferente y cada uno depende de diferentes tipos de interacciones. Habitualmente, se describen cuatro niveles: *primario, secundario, terciario* y *cuaternario*. La primera, la estructura primaria, se refiere a la secuencia de aminoácidos de una proteína, mientras que los últimos tres niveles se refieren a la organización de la molécula en el espacio. Para comprender el mecanismo de acción y la función biológica de una proteína, es esencial saber cómo se construye esa proteína.

### Estructura primaria

La estructura primaria de un polipéptido es la secuencia lineal específica de aminoácidos que constituyen la cadena. Con 20 bloques de construcción diferentes, la cantidad de polipéptidos diferentes que se pueden formar es $20^n$, donde $n$ es el número de aminoácidos en la cadena. Debido a que la mayoría de los polipéptidos contienen más de 100 aminoácidos, la variedad de secuencias posibles es esencialmente ilimitada. La información para el orden preciso de aminoácidos en cada proteína que un organismo puede producir está codificada dentro del genoma de ese organismo.

Como veremos más adelante, la secuencia de aminoácidos proporciona la información necesaria para determinar la forma tridimensional de una proteína y, por tanto, su función. La secuencia de aminoácidos, por tanto, es muy importante, y los cambios que surgen en la secuencia como resultado de mutaciones genéticas en el DNA pueden no tolerarse fácilmente. El ejemplo más antiguo y mejor estudiado de esta relación es el cambio en la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina que causa la *anemia drepanocítica*. Esta anemia severa y heredada resulta únicamente de un cambio único en la secuencia de aminoácidos dentro de la molécula de hemoglobina: un residuo de valina no polar está presente donde normalmente se encuentra un ácido glutámico cargado. Este cambio en la estructura de la hemoglobina puede tener un efecto dramático en la forma de los glóbulos rojos, convirtiéndolos de células en forma de disco en células en forma de hoz

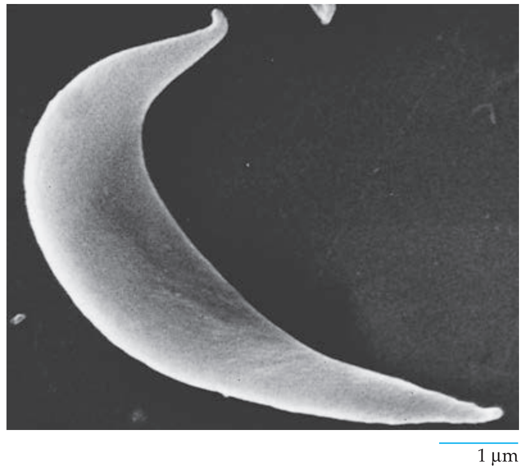



**FIGURA 2-29 Micrografía electrónica de barrido** de un glóbulo rojo de una persona con anemia de células falciformes. Compare con la micrografía de un glóbulo rojo normal de la figura 4.32*a*.

FUENTE: Cortesía de J. T. Thornwaite, B. F. Cameron y R. C. Leif.

(**FIGURA 2-29**), que tienden a obstruir los vasos sanguíneos pequeños, causando dolor y crisis que ponen en peligro la vida. No todos los cambios de aminoácidos tienen un efecto tan dramático, como lo demuestran las diferencias en la secuencia de aminoácidos en la misma proteína entre organismos relacionados. El grado de tolerancia de los cambios en la secuencia primaria depende del grado en que se altere la forma de la proteína o los residuos funcionales críticos.

La primera secuencia de aminoácidos de una proteína fue determinada por Frederick Sanger y sus colaboradores en la Universidad de Cambridge a principios de la década de 1950. Se eligió la insulina de vaca para el estudio debido a su disponibilidad y sus cadenas de polipéptido de tamaño pequeño, de 21 y 30 aminoácidos cada una. La *secuenciación* de la insulina fue una hazaña trascendental en el campo emergente de la biología molecular. Reveló que las proteínas, las moléculas más complejas en las células, tienen una subestructura definible que no es regular ni repetitiva, a diferencia de los polisacáridos. Cada polipéptido particular, ya sea insulina o alguna otra especie, tiene una secuencia precisa de aminoácidos que no varía de una molécula a otra. Con el advenimiento de las técnicas para la secuenciación rápida del DNA (véase la sección 18.22), la estructura primaria de un polipéptido puede deducirse a partir de la secuencia de nucleótidos del gen codificador. En los últimos años, las secuencias completas de los genomas de cientos de organismos, incluidos los humanos, han sido determinadas. Esta información eventualmente permitirá que los investigadores aprendan sobre cada proteína que un organismo puede fabricar. Sin embargo, la traducción de la información sobre la secuencia primaria en el conocimiento de niveles más altos de la estructura de la proteína sigue siendo un desafío formidable.

### Estructura secundaria

Toda la materia existe en el espacio y, por tanto, tiene una forma tridimensional. Las proteínas están formadas por enlaces entre un gran número de átomos; en consecuencia, su forma es compleja. El término **conformación** se refiere a la disposición tridimensional de los átomos de una molécula, es decir, a su organización espacial. La estructura secundaria describe la conformación de porciones de la cadena polipeptídica. Los primeros estudios sobre la estructura secundaria fue realizada por Linus Pauling y Robert Corey del Instituto de Tecnología de California. Al estudiar la estructura de los péptidos simples que consisten en unos pocos aminoácidos unidos, Pauling y Corey concluyeron que las

cadenas polipeptídicas existen en conformaciones preferidas que proporcionan la mayor cantidad posible de enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos vecinos.

Se propusieron dos conformaciones. En una conformación, la cadena principal del polipéptido asumió la forma de una espiral cilíndrica y torcida llamada la **hélice alfa (α)** (**FIGURA 2-30*a***). La columna central se encuentra en el interior de la hélice, y las cadenas laterales se proyectan hacia afuera. La estructura helicoidal se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre los átomos de un enlace peptídico y los situados justo encima y debajo de él a lo largo de la espiral (figura 2-30*b*). Los patrones de difracción de rayos X de las proteínas reales producidas durante la década de 1950 revelaron la existencia de la hélice alfa, primero en la proteína queratina que se encuentra en el cabello y luego en varias proteínas que se unen al oxígeno, como la mioglobina y la hemoglobina (figura 2-35). Las superficies en lados opuestos de una hélice pueden tener propiedades muy diferentes. En las proteínas solubles en agua, la superficie externa de una hélice a menudo contiene residuos polares en contacto con el disolvente, mientras que la superficie que mira hacia adentro contiene típicamente cadenas laterales no polares.

La segunda conformación propuesta por Pauling y Corey fue la **lámina beta (β)**, que consiste en varios segmentos de un polipéptido que yacen uno al lado del otro (**FIGURA 2-31*a***). A diferencia de la forma cilíndrica en espiral de la hélice α, la cadena principal de cada segmento de polipéptido (o **cadena β**) en una lámina β adopta una conformación plegada o plisada (figura 2-31*a*). Al igual que la hélice α, la lámina β también se caracteriza por una gran cantidad de enlaces de hidrógeno, pero estos están orientados perpendicularmente al eje largo de la cadena polipeptídica y se proyectan desde una parte de la cadena a otra (figura 2-31*b*). Los filamentos de una lámina β se pueden disponer paralelos entre sí, con filamentos vecinos que corren en la misma dirección, o antiparalelos, con los filamentos vecinos corriendo en direcciones opuestas. La figura 2-31*b*) muestra una hoja β antiparalela. Al igual que la hélice α, la hoja β también se ha encontrado en muchas proteínas diferentes. Debido a que las cadenas β están muy extendidas, la lámina β resiste las fuerzas de tracción (tensión). La seda está compuesta de una proteína que contiene una gran cantidad de lámina β; se cree que las fibras de seda deben su fortaleza a esta característica arquitectónica. Sorprendentemente, una sola fibra de seda de araña, que puede ser un décimo del grosor de un cabello humano, es más o menos cinco veces más fuerte que una fibra de acero de peso comparable.

Aquellas partes de una cadena polipeptídica no organizadas en una hélice α o una lámina β pueden consistir en bisagras, giros, bucles o extensiones en forma de dedo. A menudo, estas son las porciones más flexibles de una cadena polipeptídica y los sitios de mayor actividad biológica. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpos son conocidas por sus interacciones específicas con otras moléculas (antígenos); estas interacciones están mediadas por una serie de bucles en un extremo de la molécula de anticuerpo (véanse las figuras 17-15 y 17-16). Los diversos tipos de estructuras secundarias se representan más sencillamente como se muestra en la **FIGURA 2-32:** las hélices α se representan mediante cintas helicoidales, las cadenas β como flechas aplanadas y los segmentos de conexión como cadenas más delgadas.

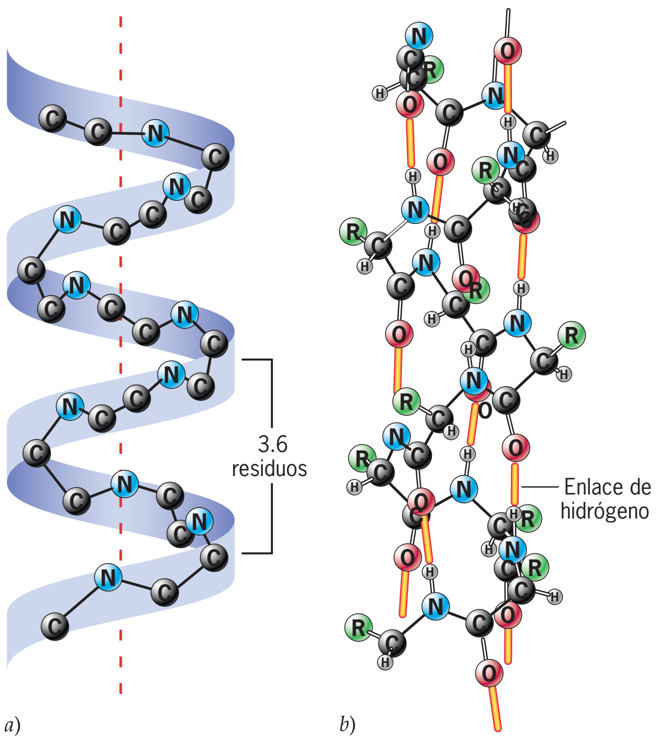



**FIGURA 2-30 La hélice alfa.** *a*) La trayectoria helicoidal alrededor de un eje central tomada por la cadena principal del polipéptido en una región de alpha hélice. Cada vuelta completa (360°) de la hélice corresponde a 3.6 residuos de aminoácidos. La distancia a lo largo del eje entre los residuos adyacentes es 15 Å. *b*) La disposición de los átomos de la cadena principal de la hélice α y los enlaces de hidrógeno que se forman entre los aminoácidos. Debido a la rotación helicoidal, los enlaces peptídicos de cada cuarto aminoácido se acercan mucho. El enfoque del grupo carbonilo (C═O) de un enlace peptídico al grupo imino (H—N) de otro enlace peptídico da como resultado la formación de enlaces de hidrógeno entre ellos. Los enlaces de hidrógeno (barras de color naranja) son esencialmente paralelos al eje del cilindro y mantienen unidas las vueltas de la cadena.

FUENTE: Ilustraciones (*a*, *b*), Irving Geis. Imagen de la Colección Irving Geis/Instituto Médico Howard Hughes. Derechos propiedad de HHMI. Reproducida con autorización.

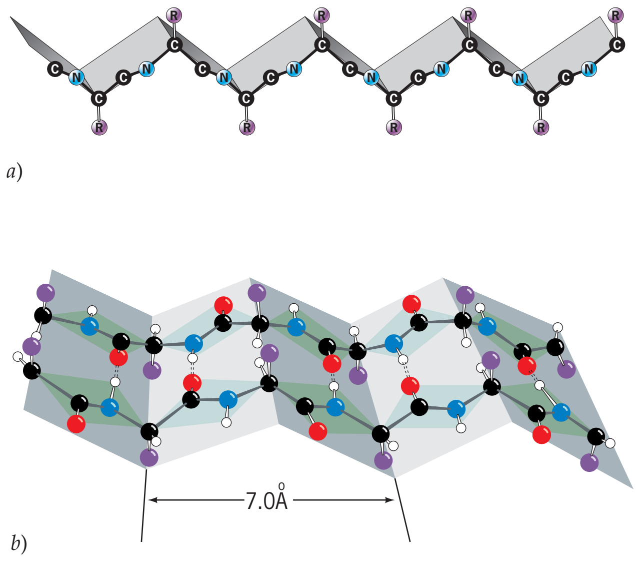



**FIGURA 2-31 La hoja β.** *a*) Cada polipéptido de una lámina β adopta una conformación extendida pero plisada denominada una cadena β. Los pliegues resultan de la ubicación de los carbonos α por encima y por debajo del plano de la lámina. Las cadenas laterales sucesivas (grupos R en la figura) se proyectan hacia arriba y hacia abajo desde la columna central. La distancia a lo largo del eje entre los residuos adyacentes es de 3.5 Å. *b*) Una lámina β consiste en un número de cadenas β que están paralelas entre sí y se unen entre sí mediante una matriz regular de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo e imina de las cadenas principales vecinas. Los segmentos vecinos de la cadena principal del polipéptido pueden estar paralelos (en la misma dirección N-terminal → C-terminal) o antiparalelo (en la dirección N-terminal opuesta → C-terminal).

FUENTE: *b*): Ilustración, Irving Geis. Imagen de la Colección Irving Geis/Instituto Médico Howard Hughes. Derechos propiedad de HHMI. Reproducida con autorización.

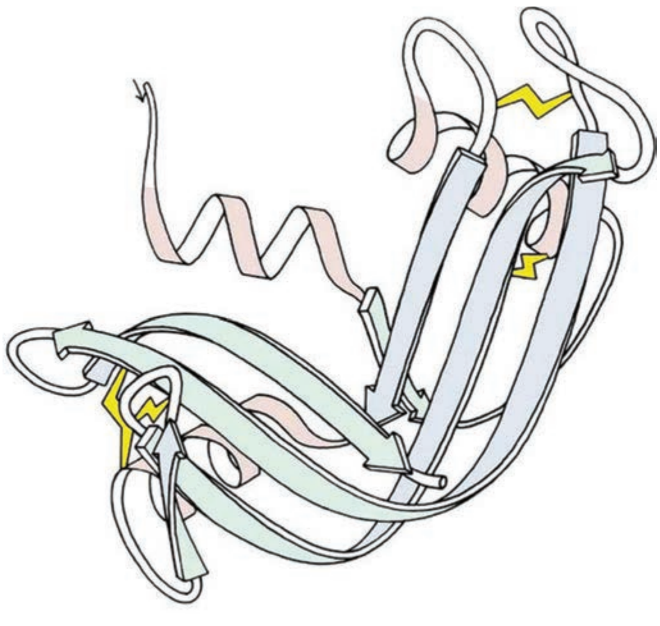


**FIGURA 2-32 Un modelo de cinta de ribonucleasa.** Las regiones α hélices se representan como espirales y las cadenas β como cintas aplanadas con las flechas que indican la dirección N-terminal → C-terminal del polipéptido. Aquellos segmentos de la cadena que no adoptan una estructura secundaria regular (es decir, una hélice alpha o una cadena beta) consisten principalmente en bucles y giros. Los enlaces disulfuro se muestran en amarillo.

FUENTE: Dibujado a mano por Jane S. Richardson.

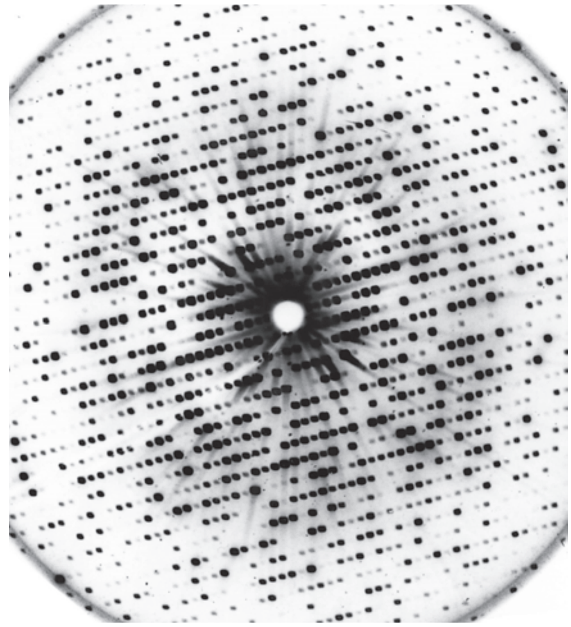


**FIGURA 2-33 Un patrón de difracción de rayos X de mioglobina.** El patrón de manchas se produce cuando un haz de rayos X es difractado por los átomos en el cristal de proteína, causando que los rayos X golpeen la película en sitios específicos. La información derivada de la posición y la intensidad (oscuridad) de los puntos se puede utilizar para calcular las posiciones de los átomos en la proteína que difracta el haz, lo que lleva a estructuras complejas como la que se muestra en la figura 2-35.

FUENTE: Cortesía de John C. Kendrew.

**REPASO**

1. ¿En qué se diferencian las propiedades de una hélice α de una cadena β? ¿Cómo son similares?

## 2.10 Estructura terciaria de las proteínas

El siguiente nivel por encima de la estructura secundaria es la estructura terciaria, que describe la conformación de todo el polipéptido. Mientras que la estructura secundaria se estabiliza principalmente por enlaces de hidrógeno entre átomos que forman los enlaces peptídicos de la cadena principal, la estructura terciaria se estabiliza mediante una matriz de enlaces no covalentes entre las diversas cadenas laterales de la proteína. La estructura secundaria se limita en gran medida a un pequeño número de conformaciones, pero la estructura terciaria es prácticamente ilimitada.

La estructura terciaria detallada de una proteína generalmente se determina usando la técnica de **cristalografía de rayos X**. En esta técnica (que se describe con más detalle en las secciones 3.6 y 18.16), un cristal de la proteína es bombardeado por un rayo delgado de rayos X y la radiación es dispersada (difractada) por los electrones de los átomos de la proteína y pueden golpear un detector sensible a la radiación, formando una imagen de manchas, como las de la **FIGURA 2-33**. Estos patrones de manchas no muestran directamente la estructura de la proteína, pero los programas de computadora basados en las matemáticas de la difracción pueden usarse para derivar la estructura responsable de producir el patrón. La estructura terciaria también puede determinarse por resonancia magnética nuclear espectroscópica (NMR), un método en el que las proteínas en solución se colocan en un potente campo magnético y se sondean con ondas de radio para producir un espectro (**FIGURA 2-34*a***) que proporciona información sobre las distancias entre los átomos. Al igual que con la cristalografía de rayos X, el espectro en sí no muestra directamente la estructura de la proteína, pero los programas informáticos pueden derivar las estructuras con mayor probabilidad de dar el espectro observado (figura 2-34*b*). Los dos métodos, la cristalografía de rayos X y la NMR, tienen diferentes fortalezas y debilidades: la cristalografía de rayos X puede proporcionar estructuras de mayor resolución para proteínas más grandes, pero está limitada por la necesidad de obtener cualquier proteína para formar cristales puros. La NMR no requiere cristalización, puede proporcionar información sobre cambios dinámicos en la estructura de la proteína y puede revelar rápidamente los sitios de unión del fármaco en una proteína, pero el método se vuelve cada vez más difícil de aplicar a medida que aumenta el tamaño de la proteína.

Durante muchos años se presumió que todas las proteínas tenían una estructura tridimensional fija, que le daba a cada proteína sus propiedades únicas y funciones específicas. Fue una sorpresa descubrir en la última década que muchas proteínas de organismos superiores contienen segmentos considerables que carecen de una información definida. Ejemplos de proteínas que contienen estos tipos de segmentos no estructurados (o *desordenados*) se pueden ver en los modelos de la proteína PrP en la figura 1 de la página 63 y las colas de las histonas en la figura 12-13*c*). Las regiones desordenadas en estas proteínas se representan como líneas punteadas en las imágenes, transmitiendo el hecho de que estos segmentos del polipéptido (como trozos de espagueti) pueden ocupar muchas posiciones diferentes y, por tanto, no se pueden estudiar mediante cristalografía de rayos X. Los segmentos desordenados tienden a tener una composición de aminoácidos predecible, siendo enriquecidos en carga y residuos polares y deficientes en residuos hidrofóbicos. Es posible que se pregunte si las proteínas que carecen de una estructura completamente definida podrían participar en una función útil. De hecho, las regiones desordenadas de tales proteínas desempeñan un papel clave en los procesos celulares vitales, que a menudo se unen al DNA o a otras proteínas. Sorprendentemente, estos segmentos a menudo se someten a una transformación física una vez que se unen a un compañero apropiado y luego se ve que poseen una estructura definida y plegada.

La mayoría de las proteínas se pueden clasificar en función de su conformación general como **proteínas fibrosas**, que tie-

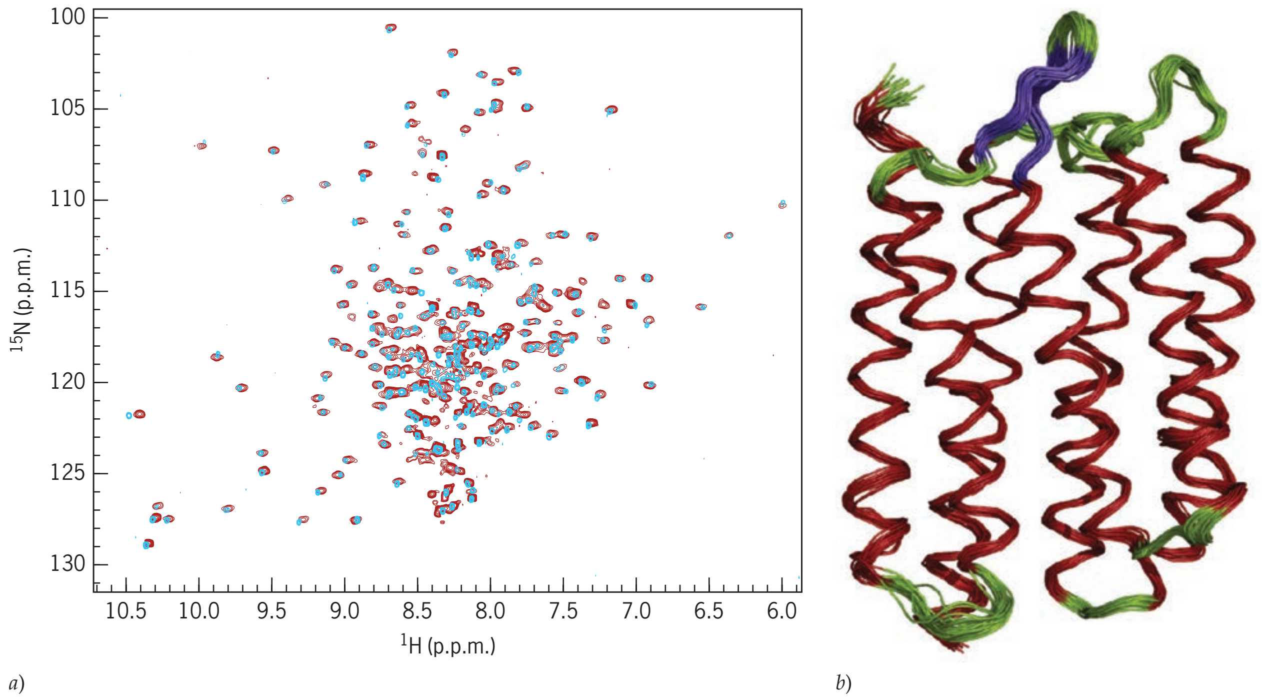



**FIGURA 2-34 La espectroscopia de NMR revela una estructura terciaria sin cristalización.** *a*) Un espectro de NMR de la proteína helicoidal que abarca la membrana sensorial de la rodopsina II. *b*) Resolver la estructura de la rodopsina sensorial II por NMR, que muestra 30 soluciones computadas consistentes con los espectros de NMR medidos. El hecho de que todas las soluciones concuerden en la forma general indica que debemos tener una gran confianza en la solución.

FUENTE: Tomada de Antoine Guatier, *et al*., *Nature Struct Mol Biol* 2010;17:768.

nen una forma alargada, o **proteínas globulares**, que tienen una forma compacta. La mayoría de las proteínas que actúan como materiales estructurales fuera de las células vivas son proteínas fibrosas, como colágenos y elastinas de tejidos conjuntivos, queratinas de cabello y piel y seda. Estas proteínas se resisten a las fuerzas de tracción o cizallamiento a las que están expuestas. Por el contrario, la mayoría de las proteínas dentro de la célula son proteínas globulares.

## Mioglobina: la primera proteína globular cuya estructura terciaria fue determinada

Las cadenas polipeptídicas de las proteínas globulares se pliegan y se trenzan en formas complejas. Los puntos distantes en la secuencia lineal de aminoácidos se aproximan y se unen mediante diversos tipos de enlaces. El primer vistazo a la estructura terciaria de una proteína globular se produjo en 1957 a través de los estudios cristalográficos de rayos X de John Kendrew y sus colegas de la Universidad de Cambridge usando patrones de rayos X de difracción como el que se muestra en la figura 2-33. La proteína que informaron fue la mioglobina.

La mioglobina funciona en el tejido muscular como un sitio de almacenamiento de oxígeno; la molécula de oxígeno está unida a un átomo de hierro en el centro de un grupo hem. (El hem es un ejemplo de un *grupo prostético*, es decir, una porción de la proteína que no está compuesta de aminoácidos, que se une a la cadena polipeptídica después de su ensamblaje en el ribosoma). Es el grupo hem de mioglobina que da la mayoría del tejido muscular es de color rojizo. El primer informe sobre la estructura de mioglobina proporcionó un perfil de baja resolución suficiente para revelar que la molécula era compacta (globular) y que la cadena polipeptídica se plegaba sobre sí misma en una disposición compleja. No hubo evidencia de regularidad o simetría dentro de la molécula, como la revelada en la descripción anterior de la doble hélice de DNA.

El perfil crudo más antiguo de la mioglobina reveló ocho tramos similares a varillas de hélice que varían de siete a 24 aminoácidos de longitud. En total, aproximadamente el 75% de los 153 aminoácidos en la cadena polipeptídica se encuentran en la conformación α-helicoidal. Este es un porcentaje inusualmente alto en comparación con el de otras proteínas que se han examinado desde entonces. No se encontró ninguna hoja β plegada. Los análisis posteriores de mioglobina utilizando datos adicionales de difracción de rayos X proporcionaron una imagen mucho más detallada de la molécula (**FIGURAS 2-35** y 3-16). Por ejemplo, se demostró que el grupo hem está situado dentro de un paquete de cadenas laterales hidrofóbicas que promueve la unión del oxígeno sin la oxidación (pérdida de electrones) del átomo de hierro. La mioglobina no contiene enlaces disulfuro; la estructura terciaria de la proteína se mantiene unida exclusivamente mediante interacciones no covalentes. Se han encontrado todos los enlaces no covalentes que se cree que ocurren entre las cadenas laterales dentro de las proteínas —enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y fuerzas de Van der Waals— (**FIGURA 2-36**). A diferencia de la mioglobina, la mayoría de las proteínas globulares contienen tanto hélices α como β. Lo que es más importante, estos primeros estudios de referencia revelaron que cada proteína tiene una estructura terciaria única que puede correlacionarse con su secuencia de aminoácidos y su función biológica.

## La estructura terciaria puede revelar similitudes inesperadas entre las proteínas

La similitud en la secuencia primaria se usa a menudo para decidir si dos proteínas pueden tener una estructura y función similares. A veces, sin embargo, se ha encontrado que las proteínas que parecían no estar relacionadas en el nivel de la secuencia primaria tienen estructuras terciarias similares. Debido a que es la estructura terciaria la que determina las interacciones y la actividad enzimática de una proteína, tal similitud estructural indica que estas proteínas pueden tener funciones similares. La **FIGURA 2-37** muestra dos proteínas, actina de células eucariotas y MreB de bacterias, cuya secuencia primaria no muestra similitud, pero cuyas estructuras terciarias están claramente relacionadas.

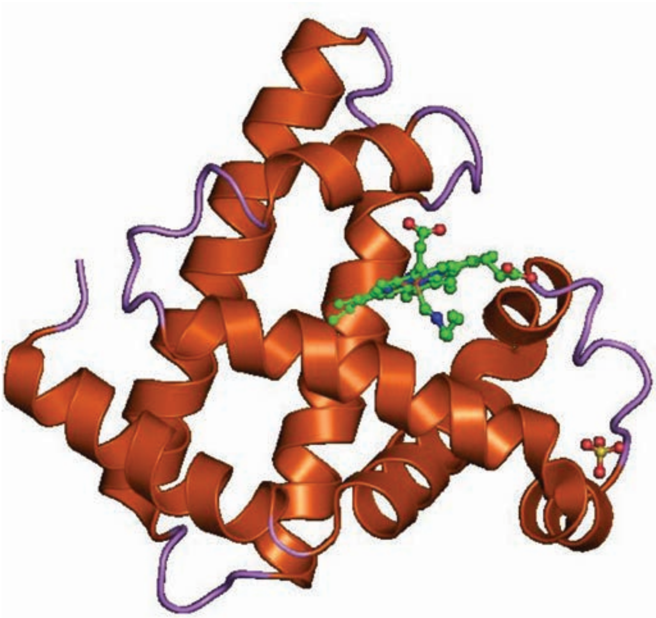


**FIGURA 2-35 La estructura tridimensional de la mioglobina.** La estructura terciaria de la mioglobina. La mayoría de los aminoácidos son parte de las hélices $\alpha$, que se muestran en rojo. Las regiones no helicoidales ocurren principalmente como giros, donde la cadena polipeptídica cambia de dirección, se muestra en verde. La posición del hem está indicada en amarillo y azul con el átomo de hierro coordinado en naranja.

FUENTE: Este trabajo está registrado bajo la licencia Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0.

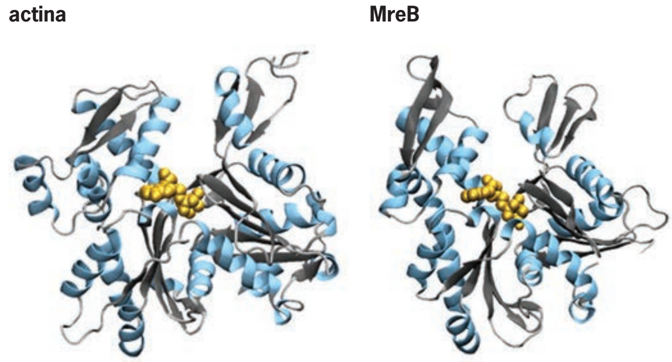



**FIGURA 2-37 Secuencia diferente, estructura similar.** Dos proteínas, actina y MreB, cuyas secuencias primarias son completamente diferentes pero que comparten una estructura terciaria común.

FUENTE: Tomada de Bill Wickstead y Keith Gull. *J Cell Biol.* 194:513-525, Fig. 1.

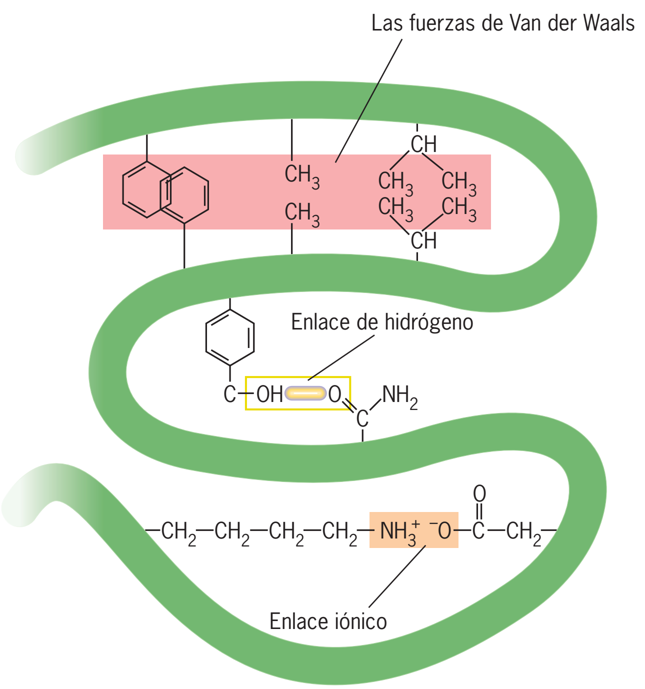



**FIGURA 2-36 Tipos de enlaces no covalentes que mantienen la conformación de las proteínas.**

Como se discutió en la sección 9.7, ambas proteínas forman filamentos citoesqueléticos.

## Dominios de proteínas

A diferencia de la mioglobina, la mayoría de las proteínas eucarióticas se componen de dos o más módulos distintivos en el espacio, que se pliegan independientemente entre sí. Por ejemplo, la enzima fosfolipasa C de mamíferos, que se muestra en la parte central de la **FIGURA 2-38**, consiste en cuatro dominios distintos, coloreados de manera diferente en el dibujo. Los diferentes dominios de un polipéptido a menudo representan partes que funcionan de una manera semiindependiente. Por ejemplo, podrían vincularse diferentes factores, como una coenzima y un sustrato o una cadena de DNA y otra proteína, o pueden moverse relativamente independientes entre sí. Los dominios de proteínas a

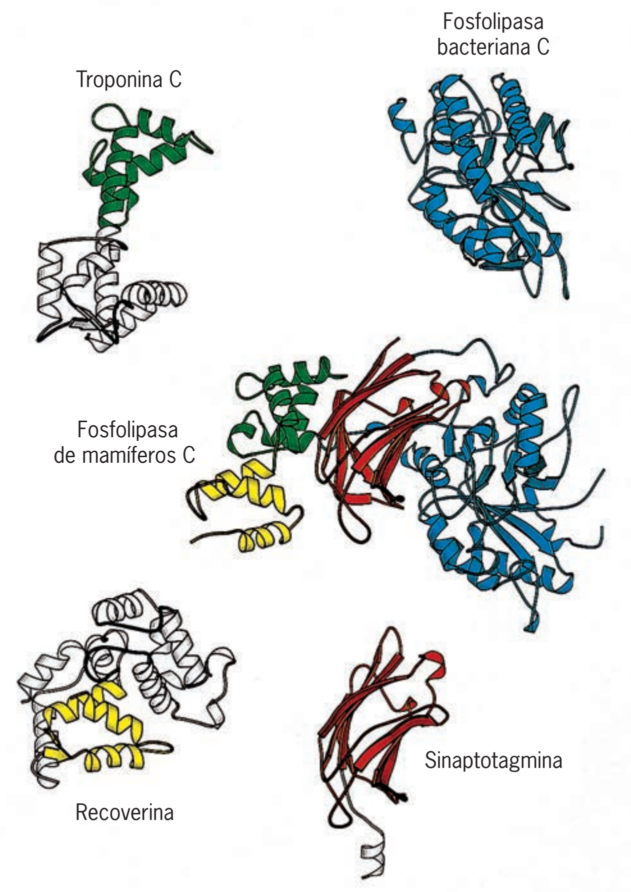



**FIGURA 2-38 Las proteínas se construyen a partir de unidades estructurales o dominios.** La enzima fosfolipasa C de mamífero está construida con cuatro dominios, indicados en diferentes colores. El dominio catalítico de la enzima se muestra en azul. Cada uno de los dominios de esta enzima se puede encontrar de forma independiente en otras proteínas según lo indicado por el color coincidente.

FUENTE: Tomada de Liisa Holm y Chris Sander, *Structure* 2007;5:167. Con autorización de Elsevier.

menudo se identifican con una función específica. Por ejemplo, las proteínas que contienen un dominio PH se unen a membranas que contienen un fosfolípido específico, mientras que las proteínas que contienen un cromodominio se unen a un residuo de lisina metilado de otra proteína. Las funciones de una proteína recién identificada a menudo pueden predecirse por los dominios de los que está hecha.

Se cree que muchos polipéptidos que contienen más de un dominio surgieron durante la evolución mediante la fusión de genes que codificaban diferentes proteínas ancestrales, y cada dominio representaba una parte que una vez fue una molécula separada. Cada dominio de la molécula de fosfolipasa C de mamíferos, por ejemplo, se ha identificado como una unidad homóloga en otra proteína (figura 2-38). Algunos dominios se han encontrado solo en una o algunas proteínas. Otros dominios se han barajado ampliamente durante la evolución, apareciendo en una variedad de proteínas cuyas otras regiones muestran poca o ninguna evidencia de una relación evolutiva. La combinación de dominios crea proteínas con combinaciones únicas de actividades. En promedio, las proteínas de mamíferos tienden a ser más grandes y contienen más dominios que las proteínas de organismos menos complejos, como las moscas de la fruta y la levadura.

## Cambios dinámicos dentro de las proteínas

Aunque las estructuras de cristalografía de rayos X poseen detalles exquisitos, son imágenes estáticas congeladas en el tiempo. Las proteínas, por el contrario, no son estáticas e inflexibles, pero son capaces de movimientos internos considerables. Las proteínas son, en otras palabras, moléculas con “partes móviles”. Debido a que son objetos pequeños, de tamaño nanométrico, las proteínas pueden verse muy influenciadas por la energía de su entorno. Las fluctuaciones aleatorias a pequeña escala en la disposición de los enlaces dentro de una proteína crean un movimiento térmico incesante dentro de la molécula. Las técnicas espectroscópicas, como la resonancia magnética nuclear (NMR), pueden controlar los movimientos dinámicos dentro de las proteínas y revelan cambios en los enlaces de hidrógeno, movimientos ondulados de cadenas laterales externas y la rotación completa de los anillos aromáticos de los residuos de tirosina y fenilalanina sobre uno de los enlaces simples. El papel importante que tales movimientos pueden desempeñar en la función de una proteína se ilustra en los estudios de la acetilcolinesterasa, la enzima responsable de degradar las moléculas de acetilcolina que se dejan tras la transmisión de un impulso de una célula nerviosa a otra (sección 4.18). Cuando la estructura terciaria de la acetilcolinesterasa se reveló por primera vez mediante cristalografía de rayos X, no había una vía obvia para que las moléculas de acetilcolina ingresaran en el sitio catalítico de la enzima, que estaba situado en el fondo de una garganta profunda en la molécula. De hecho, la estrecha entrada al sitio fue completamente bloqueada por la presencia de varias cadenas laterales de aminoácidos voluminosos. Usando computadoras de alta velocidad, los investigadores han sido capaces de simular los movimientos aleatorios de miles de átomos dentro de la enzima, una hazaña que no se puede lograr usando técnicas experimentales. Estas simulaciones de dinámica molecular (MD) indicaron que los movimientos de las cadenas laterales dentro de la proteína conducirían a la apertura y cierre rápidos de una “puerta” que permitiría que las moléculas de acetilcolina se difundieran en el sitio catalítico de la enzima (**FIGURA 2-39**). La estructura cristalográfica de rayos X de una proteína (es decir, su *estructura cristalina*) puede considerarse una estructura promedio, o “estado fundamental”. Una proteína puede experimentar excursiones dinámicas desde el estado fundamental y asumir conformaciones alternativas que son accesibles en base a la cantidad de la energía que contiene la proteína.

Los movimientos predecibles (no aleatorios) dentro de una proteína que se desencadenan por la unión de una molécula específica se describen como **cambios conformacionales**. Los cambios conformacionales típicamente involucran los movimientos coordinados de varias partes de la molécula. Una comparación de los polipéptidos representados en las figuras 3*a*) y 3*b*) de la página 69 muestra el cambio conformacional dramático que se produce en una proteína bacteriana (GroEL) cuando interactúa con otra proteína (GroES).

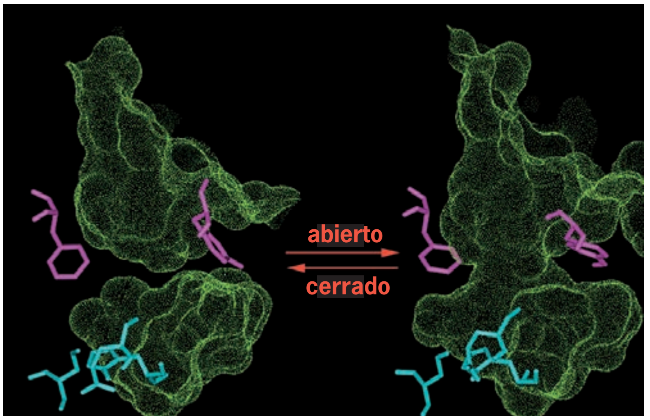



**FIGURA 2-39** Movimientos dinámicos dentro de la enzima acetilcolinesterasa. Una porción de la enzima se representa aquí en dos conformaciones diferentes: 1) una conformación cerrada (izquierda) en la que la entrada al sitio catalítico está bloqueada por la presencia de anillos aromáticos que forman parte de las cadenas laterales de residuos de tirosina y fenilalanina (se muestra en morado) y 2) una conformación abierta (derecha) en la que los anillos aromáticos de estas cadenas laterales se han salido del camino, abriendo la “puerta” para permitir que las moléculas de acetilcolina entren en el sitio catalítico. Estas imágenes se construyen utilizando programas informáticos que tienen en cuenta una gran cantidad de información sobre los átomos que componen la molécula, incluidas las longitudes de enlace, los ángulos de enlace, atracción y repulsión electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, etc. Al usar esta información, los investigadores pueden simular los movimientos de los diversos átomos en un periodo muy corto, lo que proporciona imágenes de las conformaciones que la proteína puede asumir. Se puede encontrar una animación de esta imagen en la web en http://mccammon.ucsd.edu

FUENTE: Cortesía de J. Andrew Mccammon.

Prácticamente todas las actividades en las que participa una proteína se acompañan de cambios conformacionales dentro de la molécula (véase http://molmovdb.org para ver ejemplos). El cambio conformacional en la proteína miosina que ocurre durante la contracción muscular se muestra en la figura 9-52. En este caso, la unión de la miosina a una molécula de actina conduce a una rotación pequeña (20°) de la cabeza de la miosina, lo que da como resultado un desplazamiento de 50 a 100 Å del filamento de actina adyacente. La importancia de este evento dinámico se puede apreciar si se considera que los movimientos de su cuerpo resultan del efecto aditivo de millones de cambios conformacionales que tienen lugar dentro de las proteínas contráctiles de sus músculos.

### REPASO

1. ¿Cuáles son algunas de las diferencias entre la cistoflografía de rayos X y la NMR para determinar la estructura de las proteínas? ¿Qué puede decirnos la NMR que la cristalografía de rayos X no puede?

## 2.11 Estructura cuaternaria de las proteínas

Mientras que muchas proteínas como la mioglobina están compuestas por una sola cadena polipeptídica, la mayoría se encuentra en complejos de más de una cadena o **subunidad**. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces disulfuro covalentes,

pero la mayoría de las veces se mantienen juntas mediante enlaces no covalentes, como ocurre típicamente entre “parches” hidrofóbicos en las superficies complementarias de los polipéptidos vecinos. Se dice que los complejos proteicos tienen **estructura cuaternaria**. Dependiendo de la proteína, las cadenas polipeptídicas pueden ser idénticas o no idénticas. Un complejo de proteínas compuesto por dos subunidades idénticas se describe como un *homodímero*, mientras que un complejo de proteínas compuesto por dos subunidades no idénticas es un *heterodímero*. En la **FIGURA 2-40*a*)** se representa un dibujo de cinta de una proteína homodimérica. Las dos subunidades de la proteína se dibujan en diferentes colores, y los residuos hidrofóbicos que forman los sitios complementarios de contacto están indicados.

## La estructura de la hemoglobina

La proteína de múltiples subunidades mejor estudiada es la hemoglobina, la proteína transportadora de $O_2$ de los glóbulos rojos. Una molécula de hemoglobina humana consiste en dos polipéptidos de α-globina y dos de β-globina (figura 2-40*b*), cada uno de los cuales se une a una sola molécula de oxígeno. La elucidación de la estructura tridimensional de la hemoglobina por Max Perutz de la Universidad de Cambridge en 1959 fue uno de los primeros hitos en el estudio de la biología molecular. Perutz demostró que cada uno de los cuatro polipéptidos de globina de una molécula de hemoglobina tiene una estructura terciaria similar a la mioglobina, un hecho que sugiere fuertemente que las dos proteínas habían evolucionado a partir de un polipéptido ancestral común con un mecanismo de unión a $O_2$ común. Perutz también comparó la estructura de las versiones oxigenada y desoxigenada de la hemoglobina. Al hacerlo, descubrió que la unión del oxígeno estaba acompañada por el movimiento del átomo de hierro unido más cerca del plano del grupo hem. Este cambio aparentemente intrascendente en la posición de un solo átomo provocó una hélice α a la que está conectado el hierro, que a su vez condujo a una serie de movimientos cada vez más grandes dentro y entre las subunidades. Este hallazgo reveló por primera vez que las funciones complejas de las proteínas se pueden llevar a cabo mediante pequeños cambios en su conformación.

## Interacciones proteína-proteína

Aunque la hemoglobina consta de cuatro subunidades, todavía se considera una sola proteína con una sola función. Se conocen muchos ejemplos en los que diferentes proteínas, cada una con una función específica, se asocian físicamente para formar un **complejo multiproteico** mucho más grande. Uno de los primeros complejos multiproteicos que se descubrieron y estudiaron fue el complejo piruvato deshidrogenasa de la bacteria *Escherichia coli*, que consta de 60 cadenas polipeptídicas que constituyen tres enzimas diferentes (**FIGURA 2-41**). Las enzimas que componen este complejo catalizan una serie de reacciones que conectan dos vías metabólicas, la glucólisis y el ciclo de TCA (véase figura 5.7). Debido a que las enzimas están tan estrechamente asociadas, el producto de una enzima puede canalizarse directamente a la siguiente enzima en la secuencia sin diluirse en el medio acuoso de la célula.

Los complejos multiproteicos que se forman dentro de la célula no son necesariamente conjuntos estables, como el complejo piruvato deshidrogenasa. De hecho, la mayoría de las proteínas interactúan con otras proteínas en patrones altamente dinámicos, asociándose y disociándose dependiendo de las condiciones dentro de la célula en cualquier momento dado. Las proteínas que interactúan tienden a tener superficies complementarias. A menudo, una porción proyectada de una molécula encaja en un bolsillo dentro de su compañero. Una vez que las dos moléculas han

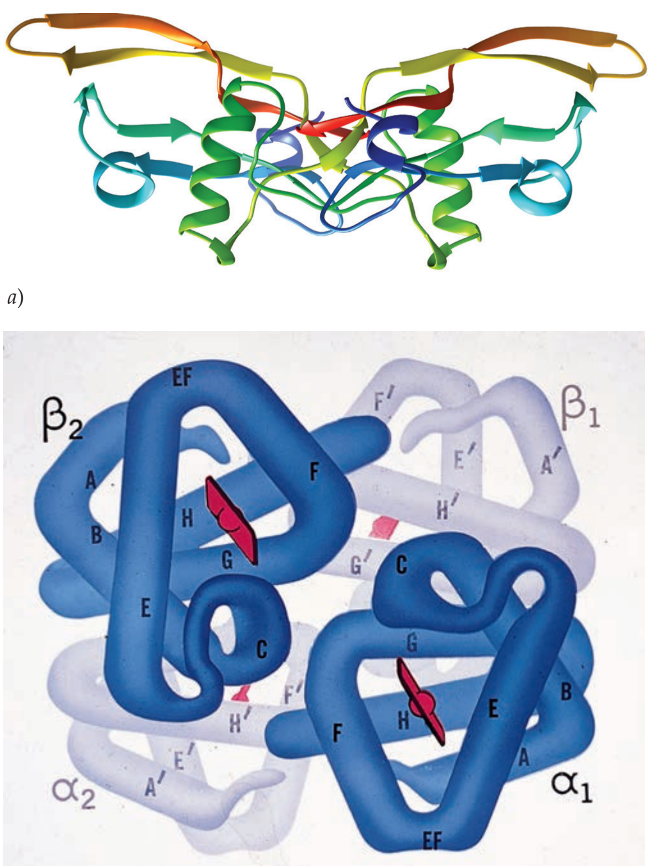



**FIGURA 2-40 Proteínas con estructura cuaternaria.** *a*) Dibujo del factor de crecimiento transformante β2 (TGF-β2), una proteína que es un dímero compuesto por dos subunidades idénticas. *b*) Dibujo de una molécula de hemoglobina, que consiste en dos cadenas de α-globina y dos cadenas de β-globina (un heterotetrámero) unidas por enlaces no covalentes. Cuando los cuatro polipéptidos de globina se ensamblan en una molécula de hemoglobina completa, la cinética de unión y liberación de $O_2$ es bastante diferente de la que muestran los polipéptidos aislados. Esto se debe a que la unión de $O_2$ a un polipéptido provoca un cambio conformacional en los otros polipéptidos que altera su afinidad por las moléculas de $O_2$.

FUENTE: *a*) De www.rcsb.org; *b*) ilustración, Irving Geis. Imagen de Irving Geis reproducida con permiso de AAAS. Colección/Instituto Médico Howard Hughes. Derechos propiedad de HHMI. Reproducida con autorización.

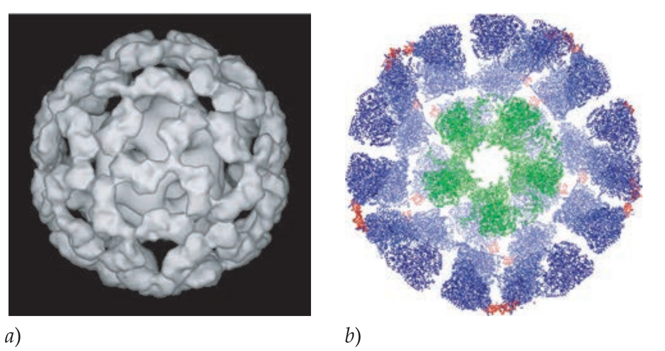
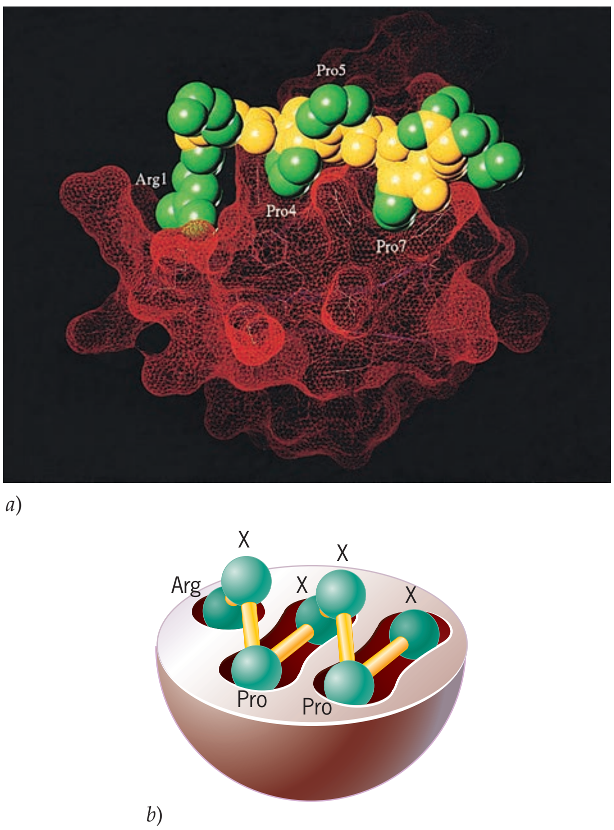



**FIGURA 2-41 Piruvato deshidrogenasa: un complejo multiproteico.** *a*) Reconstrucción tridimensional del subcomplejo bacteriano piruvato deshidrogenasa E1E2 determinado por microscopía electrónica. Su masa molecular es de 11 millones de daltones. *b*) Estructura molecular del complejo piruvato deshidrogenasa determinada por el ajuste de las estructuras cristalinas de las proteínas de las subunidades en la estructura a gran escala observada en el microscopio electrónico. El núcleo del complejo consiste en moléculas de dihidrolipoil acetiltransferasa (verde). Tetrámeros de piruvato deshidrogenasa (azul) forman una capa exterior alrededor del núcleo. El complejo completo de piruvato deshidrogenasa contiene una tercera proteína que no se resuelve aquí, y es aún más grande.

FUENTE: Tomada de Jacqueline Milne, *et al*. *Embo J* 2002;21:5587–98

entrado en contacto cercano, su interacción se estabiliza mediante enlaces no covalentes.

El objeto de color rojizo en la **FIGURA 2-42*a*)** se llama dominio SH3, y se encuentra como parte de más de 200 proteínas diferentes involucradas en la señalización molecular. La superficie de un dominio SH3 contiene "bolsas" hidrofóbicas poco profundas que se llenan por "perillas" complementarias que se proyectan desde otra proteína (figura 2-42*b*). Se ha identificado un gran número de dominios estructurales diferentes que, como SH3, actúan como adaptadores para mediar interacciones entre proteínas. En muchos casos, las interacciones proteína-proteína se regulan mediante modificaciones, como la adición de un grupo fosfato a un aminoácido clave, que actúa como un interruptor para activar o desactivar la capacidad de la proteína para unirse a una proteína asociada. A medida que se descubren actividades moleculares cada vez más complejas, la importancia de las interacciones entre proteínas se ha vuelto cada vez más evidente. Por ejemplo, procesos tan diversos como la síntesis de DNA, la formación de ATP y el procesamiento de RNA se logran mediante "máquinas moleculares" que consisten en un gran número de proteínas que interactúan, algunas de las cuales forman relaciones estables y otras relaciones transitorias. Se han purificado varios cientos de complejos proteicos diferentes en estudios a gran escala sobre levadura.




*a*)

*b*)

**FIGURA 2-42 Interacciones proteína-proteína.** *a*) Un modelo que ilustra las superficies moleculares complementarias de partes de dos proteínas que interactúan. La molécula de color rojizo es un dominio SH3 de la enzima PI3K, cuya función se analiza en el capítulo 15. Este dominio se une específicamente a una variedad de péptidos que contienen prolina, como el que se muestra en el modelo de llenado de espacio en la parte superior de la figura. Los restos de prolina en el péptido, que se ajustan en bolsas hidrofóbicas en la superficie de la enzima, están indicados. La cadena principal polipeptídica del péptido es de color amarillo, y las cadenas laterales son de color verde. *b*) Modelo esquemático de la interacción entre un dominio SH3 y un péptido que muestra la manera en que ciertos residuos del péptido se ajustan en bolsas hidrofóbicas en el dominio SH3.
FUENTE: Tomada de Hongtao Yu y Stuart Schreiber, *Cell* 1994;76:940, con permiso de Elsevier. Cortesía de Hongtao Yu y Stuart Schreiber.

**REPASO**

1. Describe la diferencia entre la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

## 2.12 Plegamiento de las proteínas

La elucidación de la estructura terciaria de la mioglobina a fines de la década de 1950 condujo a una apreciación de la complejidad de la arquitectura de la proteína. De inmediato surgió una pregunta importante: ¿cómo surge una organización tan compleja, plegada y asimétrica en la célula? La primera idea de este problema comenzó con una observación fortuita en 1956 por Christian Anfinsen en los Institutos Nacionales de Salud. Anfinsen estaba estudiando las propiedades de la ribonucleasa A, una pequeña enzima que consiste en una sola cadena polipeptídica de 124 aminoácidos con cuatro enlaces disulfuro que unen varias partes de la cadena. Los enlaces disulfuro de una proteína típicamente se rompen (reducen) mediante la adición de un agente reductor, como el mercaptoetanol, que convierte cada puente disulfuro en un par de grupos sulfhidrilo (—SH) (véase dibujo, p. 50). Para que todos los enlaces disulfuro sean accesibles para el agente reductor, Anfinsen descubrió que la molécula tenía que desplegarse parcialmente en primer lugar. El despliegue o la desorganización de una proteína se denomina **desnaturalización**, y puede ser provocada por una variedad de agentes, incluidos los detergentes, disolventes orgánicos, radiación, calor y compuestos como la urea y el cloruro de guanidina, todos los cuales interfieren con las diversas interacciones que estabilizan la estructura terciaria de una proteína.

Cuando Anfinsen trató las moléculas de ribonucleasa con mercaptoetanol y urea concentrada, descubrió que la preparación perdió toda su actividad enzimática, lo que se esperaría si las moléculas de proteína se hubieran desplegado por completo. Cuando eliminó la urea y el mercaptoetanol de la preparación, descubrió, para su sorpresa, que las moléculas recuperaron su actividad enzimática normal. Las moléculas de ribonucleasa activa que se habían formado nuevamente a partir de la proteína desplegada eran indistinguibles estructural y funcionalmente de las moléculas correctamente plegadas (es decir, **nativas**) presentes al comienzo del experimento (**FIGURA 2-43**). Después de un amplio estudio, Anfinsen concluyó que la secuencia lineal de aminoácidos contenía toda la información requerida para la formación de los polipéptidos de conformación tridimensional. La ribonucleasa, en otras palabras, es capaz de **autoensamblarse**. Como se discutió en el capítulo 3, los eventos tienden a progresar hacia estados de menor energía. De acuerdo con este concepto, la estructura terciaria que asume una cadena polipeptídica después del plegamiento es la estructura accesible con la energía más baja, lo que la convierte en la estructura más estable termodinámicamente que puede formar esa cadena. Parecería que la evolución selecciona para aquellas secuencias de aminoácidos que generan una cadena polipeptídica capaz de llegar espontáneamente a un estado nativo significativo en un periodo biológicamente razonable.

### Dinámica de plegamiento de las proteínas

Ha habido numerosas controversias en el estudio del plegamiento de las proteínas. Muchas de estas controversias provienen del hecho de que el campo se caracteriza por procedimientos computacionales, espectroscópicos y experimentales altamente sofisticados que se requieren para estudiar eventos moleculares complejos que típicamente ocurren en una escala de tiempo de microsegundos. Estos esfuerzos a menudo arrojaron resultados contradictorios y generaron datos que están abiertos a más de una interpretación. En aras de la simplicidad, se restringirá la discusión a proteínas "simples", como la ribonucleasa, que consisten en un solo dominio. Un tema fundamental que ha sido ampliamente debatido es si todos los miembros de una población de proteínas

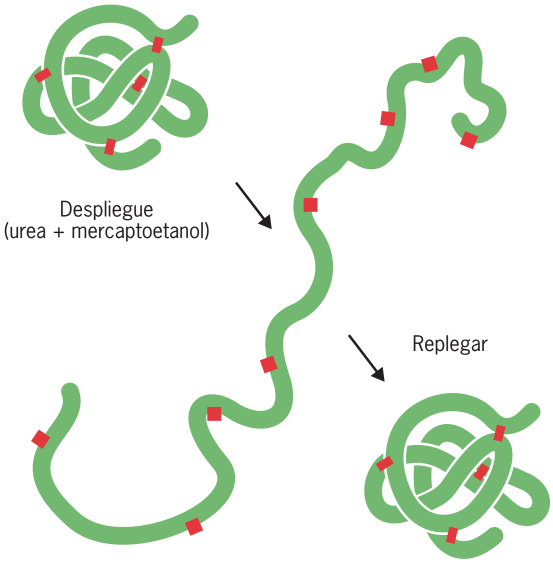



**FIGURA 2-43 Desnaturalización y replegamiento de ribonucleasa.** Una molécula de ribonucleasa nativa (con enlaces disulfuro intramoleculares indicados) se reduce y se despliega con β-mercaptoetanol y urea 8 M. Después de la eliminación de estos reactivos, la proteína sufre un replegamiento espontáneo.

FUENTE: De C. J. Epstein, R. F. Goldberger y C. B. Anfinsen. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1963;28:439. Reproducida con autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press.

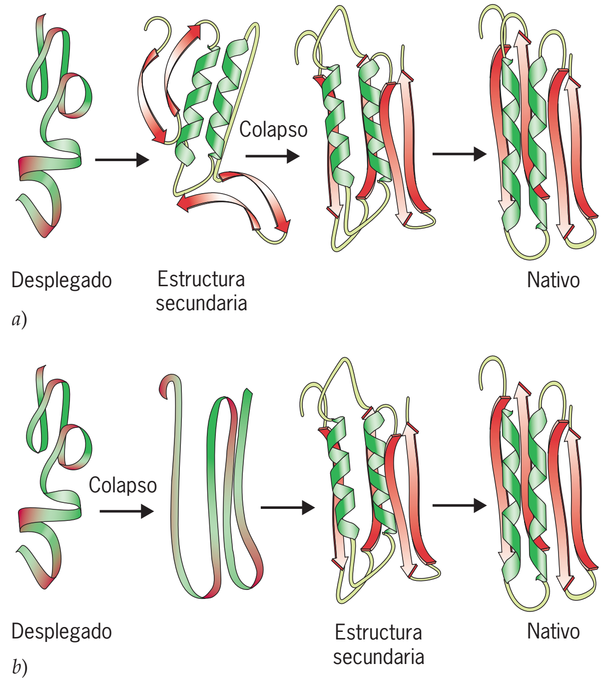



**FIGURA 2-44 Dos vías alternativas** por las cuales una proteína recién sintetizada o desnaturalizada podría alcanzar su conformación nativa. Los segmentos rizados representan hélices α, y las flechas representan cadenas β.

desplegadas de una sola especie que se pliegan a lo largo de una ruta o pliegue similar por medio de un conjunto diverso de rutas que de alguna manera convergen en el mismo estado nativo. Estudios recientes que simularon el plegamiento con la ayuda de computadoras de alta velocidad sugirieron que ambos puntos de vista son correctos, y que las proteínas inicialmente exploran una amplia gama de conformaciones diferentes cuando comienzan a retirarse pero finalmente se canalizan hacia un conjunto cada vez más restringido de configuraciones posibles (véase **FIGURA 2-45**).

Otro tema que ha sido debatido en forma redonda se refiere a los tipos de eventos que ocurren en varias etapas durante el proceso de plegado. En el curso representado en la **FIGURA 2-44*a*)**, el plegamiento de proteínas se inicia mediante interacciones entre residuos vecinos que conducen a la formación de gran parte de la estructura secundaria de la molécula. Una vez que las hélices α y las hojas β se forman, el plegamiento posterior es impulsado por interacciones hidrofóbicas que entierran los residuos no polares juntos en el núcleo central de la proteína. De acuerdo con un esquema alternativo que se muestra en la figura 2-44*b*), el primer evento importante en el plegamiento de proteínas es el colapso hidrofóbico del polipéptido para formar una estructura compacta en la cual la estructura adopta una topología nativa. Solo después de este colapso se desarrolla una estructura secundaria significativa. Estudios recientes indican que las dos vías representadas en la figura 2-44 se encuentran en extremos opuestos y que la mayoría de las proteínas probablemente se pliegan mediante un esquema de en medio de la carretera en el que la formación de estructura secundaria y la compactación se producen simultáneamente. Estos eventos de plegamiento temprano conducen a la formación de una estructura transitoria y plegada que se asemeja a la proteína nativa pero carece de muchas de las interacciones específicas entre las cadenas laterales de aminoácidos que están presentes en la molécula completamente plegada (**FIGURA 2-45**).

Si la información que regula el plegamiento está incrustada en la secuencia de aminoácidos de una proteína, entonces debería ser posible predecir la estructura terciaria de la proteína solo a partir de su secuencia. Dicha predicción estructural *de novo* ha

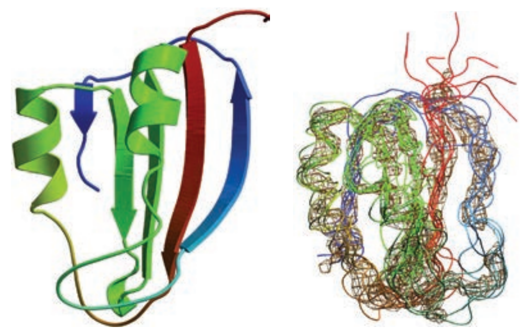


**FIGURA 2-45 A lo largo del camino de plegado.** La imagen de la izquierda muestra la estructura terciaria nativa de la enzima acilfosfatasa. La imagen de la derecha es la estructura de transición, que representa el estado de la molécula en la parte superior de una barrera de energía que debe cruzarse si la proteína va a alcanzar el estado nativo. La estructura de transición consiste en numerosas líneas individuales porque es un conjunto de estructuras estrechamente relacionadas. La arquitectura general de la estructura de transición es similar a la de la proteína nativa, pero muchas de las características estructurales más finas de la proteína completamente plegada aún no han emergido. La conversión del estado de transición a la proteína nativa implica completar la formación de la estructura secundaria, un empaquetamiento más apretado de las cadenas laterales y finalizar el entierro de las cadenas laterales hidrófobas del disolvente acuoso.

FUENTE: Tomada de K Lindorff-Larsen, *et al. Trends Biochem Sci* 2005;30:14, Fig. 1B. © 2005, con autorización de Elsevier. Imagen de Christopher Dobson.

sido un santo grial en la ciencia de las proteínas y sigue siendo un problema sin resolver. Sin embargo, si una proteína de interés está estrechamente relacionada en el nivel de secuencia primaria con otra proteína cuya estructura terciaria se conoce, entonces es posible hacer una conjetura razonable sobre la estructura terciaria de la proteína desconocida alineando los aminoácidos de la proteína desconocida en los aminoácidos correspondientes en la proteína cuya estructura es conocida, un proceso que se denomina **enhebrado**. El hecho de que la secuencia primaria determina el plegamiento de una proteína significa que las alteraciones en esta secuencia tienen el potencial de cambiar la forma en que

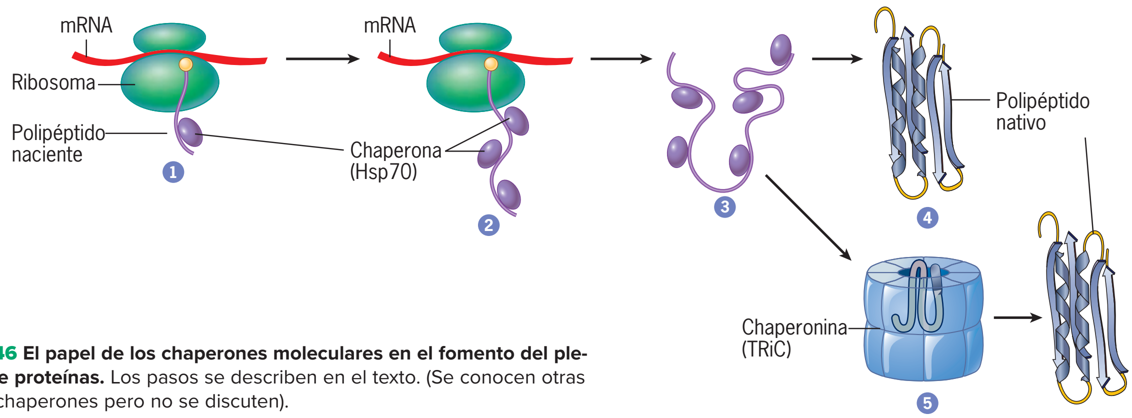



**FIGURA 2-46 El papel de los chaperones moleculares en el fomento del plegamiento de proteínas.** Los pasos se describen en el texto. (Se conocen otras familias de chaperones pero no se discuten).

una proteína se pliega, lo que lleva a una estructura terciaria anormal. De hecho, se ha descubierto que muchas mutaciones responsables de trastornos hereditarios alteran la estructura tridimensional de una proteína. En algunos casos, las consecuencias del mal plegamiento de proteínas pueden ser fatales. En la sección 2.13 se discuten dos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas fatales que resultan del plegamiento anormal de proteínas.

## El papel de los chaperones moleculares

No todas las proteínas pueden asumir su estructura terciaria final mediante un simple proceso de autoensamblaje. Esto no se debe a que la estructura primaria de estas proteínas carece de la información necesaria para el plegamiento adecuado, sino más bien porque se debe evitar que las proteínas sometidas a plegamiento interactúen de forma no selectiva con otras moléculas en los compartimientos llenos de la célula. Varias familias de proteínas han evolucionado, cuya función es ayudar a las proteínas desplegadas o mal plegadas a lograr su conformación tridimensional apropiada. Estas "proteínas auxiliares" se denominan **chaperonas moleculares** y se unen selectivamente a tramos cortos de aminoácidos hidrofóbicos que tienden a estar expuestos en proteínas no nativas pero están enterrados en proteínas que tienen una conformación nativa.

La **FIGURA 2-46** representa las actividades de dos familias de chaperones moleculares que operan en el citosol de células eucariotas. Las chaperonas moleculares están involucradas en una multitud de actividades dentro de las células, desde la importación de proteínas en organelos (ver figura 8.47*a*) hasta la prevención y reversión de la agregación de proteínas. Restringiremos la discusión a sus acciones sobre las proteínas recién sintetizadas.

Las cadenas polipeptídicas se sintetizan en los ribosomas mediante la adición de aminoácidos, uno a la vez, comenzando en el extremo N de la cadena (paso 1, figura 2-46). Los chaperones de la familia Hsp70 se unen a las cadenas polipeptídicas alargadas a medida que emergen de un canal de salida dentro de la gran subunidad del ribosoma (paso 2). Se piensa que las chaperonas Hsp70 evitan que estos polipéptidos parcialmente formados (es decir, polipéptidos *nacientes*) se unan a otras proteínas en el citosol, lo que provocaría que se agregaran o se plegaran incorrectamente. Una vez que se ha completado su síntesis (paso 3), muchas de estas proteínas son simplemente liberadas por los chaperones al citosol, donde se pliegan espontáneamente a su estado nativo (paso 4). Los chaperones unen y liberan otras proteínas repetidamente hasta que finalmente alcanzan su estado completamente plegado. Muchos de los polipéptidos más grandes se transfieren de las proteínas Hsp70 a un tipo diferente de chaperona llamada *chaperonina* (paso 5). Las chaperoninas son complejos de proteínas cilíndricas que contienen cámaras en las que los polipéptidos recién sintetizados pueden plegarse sin interferencia de otras macromoléculas en la célula. TRiC es una chaperonina pensada para ayudar en el plegamiento de hasta 15% de los polipéptidos sintetizados en células de mamíferos. El descubrimiento y el mecanismo de acción de Hsp70 y chaperoninas se discuten en profundidad en la "Vía experimental" de la sección 2.14 en la página 67.

### REPASO

1. Dado que las proteínas actúan como máquinas moleculares, explique por qué los cambios conformacionales son tan importantes en la función proteica.

# 2.13 PERSPECTIVA HUMANA

## El plegamiento incorrecto de las proteínas puede tener consecuencias mortales

En abril de 1996 se publicó un artículo en la revista médica *Lancet* que generó una gran alarma en las poblaciones de Europa. El documento describe un estudio de 10 personas afectadas con la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD), un desorden raro y fatal que ataca el cerebro, causando una pérdida de la coordinación motora y la demencia. Como muchas otras enfermedades, la CJD puede ocurrir como una enfermedad hereditaria que se presenta en ciertas familias o como una forma esporádica que aparece en personas que no tienen antecedentes familiares de la enfermedad. A diferencia de prácticamente todas las demás enfermedades hereditarias, sin embargo, también se puede adquirir CJD. Hasta hace poco, las personas que adquirieron CJD habían sido receptores de órganos o productos de órganos que fueron donados por una persona con CJD no diagnosticada. Los casos descritos en el artículo de *Lancet* de 1996 también se habían adquirido, pero la fuente aparente de la enfermedad era la carne contaminada que las personas infectadas habían comido años antes. La carne contaminada provenía de ganado criado en Inglaterra que había contraído una enfermedad neurodegenerativa que causaba que los animales perdieran la coordinación motriz y desarrollaran un comportamiento demencial. La enfermedad se conoce comúnmente como "enfermedad de las vacas locas". Los pacientes que han adquirido CJD por comer carne contaminada se pueden distinguir por varios criterios de aquellos

que padecen las formas clásicas de la enfermedad. Hasta la fecha, aproximadamente 200 personas han muerto por CJD adquiridas a partir de carne contaminada, y el número de muertes ha disminuido.[1] Una enfermedad que se presenta en familias puede rastrearse invariablemente a un gen defectuoso, mientras que las enfermedades que se adquieren de una fuente contaminada se pueden rastrear invariablemente a un agente infeccioso. ¿Cómo puede la misma enfermedad ser tanto hereditaria como infecciosa? La respuesta a esta pregunta ha surgido gradualmente durante las últimas décadas, comenzando con las observaciones de D. Carleton Gajdusek en la década de 1960 sobre una extraña enfermedad que una vez afligió a la población nativa de Papúa, Nueva Guinea. Gajdusek demostró que estos isleños estaban contrayendo una enfermedad neurodegenerativa fatal —que llamaron "kuru"— durante un ritual funerario en el que se comieron el tejido cerebral de un pariente recientemente fallecido. Las autopsias de los cerebros de pacientes que habían muerto de kuru mostraron una patología distinta, conocida como *encefalopatía espongiforme*, en la que ciertas regiones del cerebro estaban plagadas de agujeros microscópicos (vacuolaciones), lo que provocaba que el tejido se asemejara a una esponja.

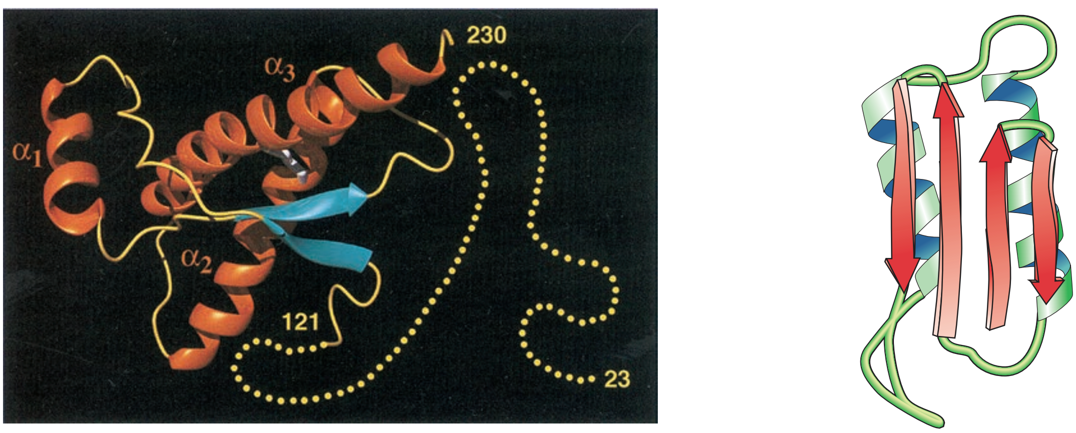
Pronto se demostró que los cerebros de los isleños que sufrían de kuru eran sorprendentemente similares en apariencia microscópica a los cerebros de personas afectadas con CJD. Esta observación planteó una pregunta importante: ¿el cerebro de una persona que sufría de CJD, que se sabía que era una enfermedad hereditaria, contenía un agente infeccioso? En 1968, Gajdusek demostró que cuando los extractos preparados a partir de una biopsia del cerebro de una persona que había muerto por CJD se inyectaban en un animal de laboratorio adecuado, ese animal desarrollaba una encefalopatía espongiforme similar a la del kuru o la CJD. Claramente, los extractos contenían un agente infeccioso, que en ese momento se suponía que era un virus.

[1] En la superficie, esto sugeriría que la epidemia ha seguido su curso, pero hay varias razones para que los funcionarios de salud pública sigan preocupados. Por un lado, los estudios de los tejidos que se habían eliminado durante las cirugías en Inglaterra indican que es probable que miles de personas estén infectadas con la enfermedad sin mostrar síntomas (discutido en *Science* 2012;335:411). Incluso si estas personas nunca desarrollan una enfermedad clínica, siguen siendo portadores potenciales que podrían transmitir la ECJ a otras personas a través de transfusiones de sangre. De hecho, se cree que al menos dos personas contrajeron CJD después de recibir sangre de un donante que albergaba la enfermedad. Estos hallazgos subrayan la necesidad de analizar sangre en busca de la presencia del agente responsable (cuya naturaleza se analiza a continuación).

En 1982 Stanley Prusiner, de la Universidad de California en San Francisco, publicó un documento que sugería que, a diferencia de los virus, el agente infeccioso responsable de CJD carecía de ácido nucleico y, en cambio, estaba compuesto únicamente de proteínas. Llamó a la proteína un prion. Esta hipótesis de "solo proteínas", como se la conoce, fue recibida originalmente con considerable escepticismo, pero los estudios posteriores de Prusiner y otros han proporcionado un apoyo abrumador para la propuesta. Se supuso inicialmente que la proteína prion era un agente externo, algún tipo de partícula similar a un virus que carecía de ácido nucleico. Contrariamente a esta expectativa, pronto se demostró que la proteína del prion estaba codificada por un gen (llamado *PRNP*) dentro de los propios cromosomas de la célula. El gen se expresa dentro del tejido cerebral normal y codifica una proteína denominada $PrP^C$ (representando la proteína prion celular) que reside en la superficie de las células nerviosas. La función precisa de $PrP^C$ continúa siendo un misterio. Una versión modificada de la proteína (designada como $PrP^{Sc}$, que significa proteína priónica scrapie) está presente en los cerebros de humanos con CJD. A diferencia de la $PrP^C$ normal, la versión modificada de la proteína se acumula dentro de las células nerviosas, formando agregados que matan las células.

En sus estados purificados, $PrP^C$ y $PrP^{Sc}$ tienen propiedades físicas muy diferentes. $PrP^C$ permanece como una molécula monomérica que es soluble en soluciones salinas y se destruye fácilmente mediante enzimas que digieren proteínas. Por el contrario, las moléculas de $PrP^{Sc}$ interactúan entre sí para formar fibrillas insolubles que son resistentes a la digestión enzimática. Con base en estas diferencias, uno podría esperar que estas dos formas de la proteína PrP estén compuestas por secuencias de aminoácidos claramente diferentes, pero este no es el caso. Las dos formas pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas, pero difieren en la forma en que la cadena polipeptídica se pliega para formar la molécula proteica tridimensional (**FIGURA 1**). Mientras que una molécula de $PrP^C$ consiste en gran parte en segmentos $\alpha$-helicoidales y bobinas de interconexión, el núcleo de una molécula $PrP^{Sc}$ está compuesto en gran parte por una lámina $\beta$.

No es difícil entender cómo un polipéptido mutante podría ser menos estable y más propenso a plegarse en la conformación de $PrP^{Sc}$ anormal, pero ¿cómo puede actuar dicha proteína como agente infeccioso? De acuerdo con la hipótesis prevale-




*a*) *b*)

**FIGURA 1 Un contraste en la estructura.** *a*) Estructura terciaria de la proteína normal ($PrP^C$), según se determina por espectroscopia de RMN. Las porciones de color naranja representan segmentos helicoidales, y las partes azules son cadenas $\beta$ cortas. La línea amarilla punteada representa la parte N-terminal del polipéptido, que carece de estructura definida. *b*) Un modelo propuesto de la proteína priónica ($PrP^{Sc}$) anormal e infecciosa, que consiste en gran parte de lámina $\beta$. La estructura terciaria real de la proteína prion no ha sido determinada. Las dos moléculas que se muestran en esta figura están formadas por cadenas polipeptídicas que pueden ser idénticas en la secuencia de aminoácidos pero plegarse de forma muy diferente. Como resultado de las diferencias en plegamiento, $PrP^C$ permanece soluble, mientras que $PrP^{Sc}$ produce agregados que matan a la célula. (Las dos moléculas que se muestran en esta figura se llaman conformadoras porque difieren solo en conformación).

Fuente: *a*) de Adriana Verschoor y cols. *J Cell Biol* 1996; vol. 133 (cubierta 3); con autorización de copyright de Rockefeller University Press; *b*) reimpreso de SB Prusiner. *Trends Biochem Sci* 1996;21:483, Copyright 1996, con autorización de Elsevier.

(*continúa*)

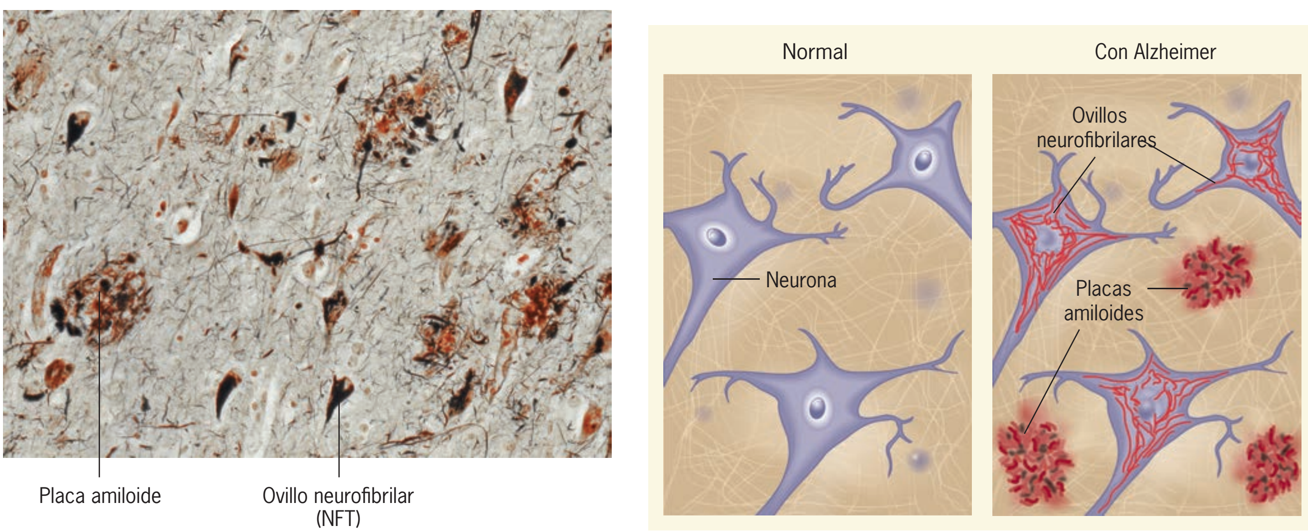
ciente, una molécula de prion anormal ($PrP^{Sc}$) se puede unir a una molécula de proteína normal ($PrP^{C}$) y hacer que la proteína normal se doble en la forma anormal. Se puede demostrar que esta conversión ocurre en el tubo de ensayo: adición de $PrP^{Sc}$ a una preparación de $PrP^{C}$ puede convertir las moléculas de $PrP^{C}$ en conformación $PrP^{Sc}$. Según esta hipótesis, la aparición de la proteína anormal en el cuerpo —ya sea como resultado de un raro evento de plegamiento incorrecto en el caso de enfermedad esporádica o por exposición a carne contaminada— inicia una reacción en cadena en la que las moléculas de proteína normales en las células gradualmente se convierten a la forma de priones deformada a medida que se reclutan en forma de granos insolubles crecientes. El mecanismo preciso por el cual los priones conducen a la neurodegeneración sigue sin estar claro.

La CJD es una enfermedad rara causada por una proteína con propiedades infectivas únicas. La enfermedad de Alzheimer (AD), por otro lado, es un trastorno común que afecta hasta al 10% de las personas que tienen al menos 65 años de edad y quizás el 40% de las personas que tienen 80 años o más. Las personas con AD muestran pérdida de memoria, confusión y pérdida de la capacidad de razonamiento. La CJD y la AD comparten una serie de características importantes. Ambas son enfermedades neurodegenerativas fatales que pueden ocurrir en una forma heredada o esporádica. Al igual que la CJD, el cerebro de una persona con la enfermedad de Alzheimer contiene depósitos fibrilares de un material insoluble conocido como *amiloide* (**FIGURA 2**).[2]

En ambas enfermedades, los depósitos fibrilares resultan de la autoasociación de un polipéptido compuesto predominantemente de lámina β. También existen muchas diferencias básicas entre las dos enfermedades: las proteínas que forman los agregados causantes de la enfermedad no están relacionadas, las partes del cerebro que se ven afectadas son distintas y la proteína responsable de la AD no se considera un agente infeccioso (es decir, no se propaga en un patrón contagioso de una persona a otra, aunque puede propagarse de una célula a otra dentro del cerebro).

En las últimas dos décadas, la investigación sobre AD ha estado dominada por la *hipótesis de amiloide*, que sostiene que la enfermedad es causada por la producción de una molécula, llamada *péptido β amiloide* (Aβ). El Aβ es originalmente parte de una proteína más grande llamada proteína precursora de amiloide (*APP*), que abarca la membrana de la célula nerviosa. El péptido Aβ se libera de la molécula de APP después de la escisión por dos enzimas específicas, β-secretasa y γ-secretasa (**FIGURA 3**). La longitud del péptido Aβ es algo variable. La especie predominante tiene una longitud de 40 aminoácidos (designada como Aβ40), pero también se produce una especie menor con dos residuos hidrofóbicos adicionales (designados como Aβ42). Ambos péptidos pueden existir en una forma soluble que consiste predominantemente de hélices α, pero Aβ42 tiene una tendencia a replegarse espontáneamente en una conformación muy diferente que contiene una hoja β considerable. Es la versión Aβ42 mal plegada de la molécula la que tiene el mayor potencial de causar daño al cerebro. Un Aβ42 tiende a autoasociarse para formar pequeños complejos (oligómeros), así como grandes agregados que son visibles como fibrillas en el microscopio electrónico. Estos fibroides amiloides se depositan fuera de las células nerviosas en forma de *placas amiloides* extracelulares (figura 2). Aunque el problema está lejos de resolverse, un cuerpo de evidencia sugiere que son los oligómeros solubles los más tóxicos para las células nerviosas, en lugar de los agregados insolubles. Las células nerviosas cultivadas, por ejemplo, son mucho más propensas a ser dañadas por la presencia de oligómeros de Aβintracelular solubles que por monómeros Aβ o agregados fibrilares extracelulares. En el cerebro, los Aβ oligómeros parecen atacar las sinapsis que conectan una célula nerviosa con otra y eventualmente conducen a la muerte de las células nerviosas. Las personas que sufren de una forma hereditaria de AD portan una mutación que conduce a un aumento de la producción del péptido Aβ42. La sobreproducción de Aβ42 puede ser causada por la posesión de copias adicionales (duplicaciones) del gen *APP*, por mutaciones en el gen *APP*, o por mutaciones en genes (*PSEN1, PSEN2*) que codifican subunidades de γ-secretasa. Las personas con tales mutaciones muestran síntomas de la enfermedad a una edad temprana, por lo general en sus 50 años. El hecho de que todas las mutaciones asociadas con estas formas

[2] Debe tenerse en cuenta que el término *amiloide* no se limita a la proteína anormal que se encuentra en la AD. Muchas proteínas diferentes son capaces de asumir una conformación anormal que es rica en hojas β, lo que hace que los monómeros de proteínas se agreguen en fibrillas amiloides características que se unen a ciertos colorantes. Las fibrillas amiloides se definen por su estructura molecular en la que las cadenas β se orientan perpendicularmente al eje largo de las fibrillas. Las fibrillas formadoras de $PrP^{Sc}$ de las enfermedades priónicas también se describen como amiloide.




*a*) *b*)

**FIGURA 2 La enfermedad de Alzheimer.** *a*) Las características definitorias del tejido cerebral de una persona que murió de la enfermedad de Alzheimer. *b*) Las placas de amiloide que contienen agregados del péptido A aparecen extracelularmente (entre las células nerviosas), mientras que los enredos neurofibrilares (NFT) aparecen dentro de las células mismas. Las NFT, que se discuten al final de la Perspectiva humana, están compuestas por marañas mal plegadas de una proteína llamada tau que está involucrada en el mantenimiento de la organización de los microtúbulos de la célula nerviosa. Tanto las placas como los ovillos han sido implicados como causa de la enfermedad.

FUENTE: *a*) © Thomas Deerinck, NCMIR/Photo Researchers, Inc, *b*) © American Health Assistance Foundation.

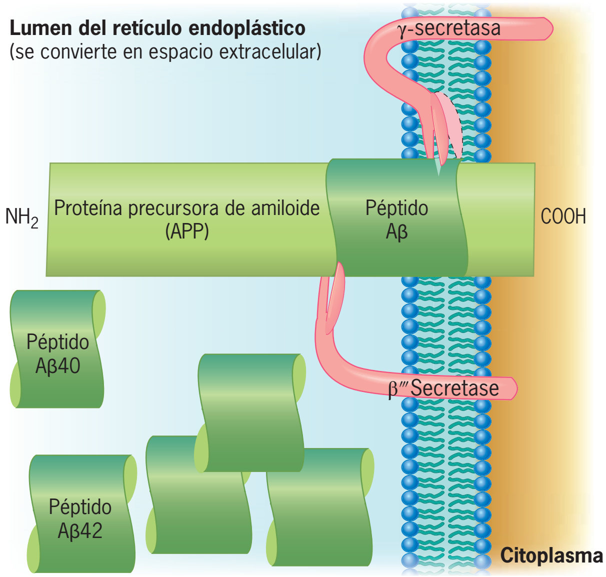



**FIGURA 3 Formación del péptido Aβ.** El péptido Aβ está tallado a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) como resultado de la escisión por dos enzimas, β-secretasa (también llamada BACE1) y γ-secretasa. Es interesante que APP y las dos secretasas sean todas proteínas que abarcan la membrana. La escisión de la APP ocurre dentro de la célula (probablemente en el retículo endoplasmático), y el producto Aβ se secreta en el espacio exterior de la célula. La γ-secretasa puede cortar en cualquiera de los dos sitios en la molécula de APP, produciendo péptidos Aβ40 o Aβ42, el último de los cuales es el principal responsable de la producción de las placas amiloides observadas en la figura 2. La γ-secretasa es una enzima multisubunitaria que escinde su sustrato en un sitio dentro de la membrana.

heredadas de aparición temprana de AD conducen a una producción incrementada de Aβ42 es el argumento más fuerte que favorece la formación de amiloide como la base subyacente de la enfermedad. El argumento más fuerte contra la hipótesis amiloide es la débil correlación que puede existir entre el número y el tamaño de las placas amiloides en el cerebro y la gravedad de la enfermedad. Las personas mayores que muestran poca o ninguna señal de pérdida de memoria o demencia pueden tener niveles relativamente altos de los depósitos de amiloide en su cerebro y aquellos con enfermedad severa pueden tener poca o ninguna deposición de amiloide.

Todos los medicamentos actualmente en el mercado para el tratamiento de AD están dirigidos solo al manejo de los síntomas; ninguno tiene ningún efecto sobre detener la progresión de la enfermedad. Con la hipótesis de amiloide como la influencia rectora, los investigadores han seguido tres estrategias básicas en la búsqueda de nuevos medicamentos para la prevención y/o reversión del deterioro mental asociado con AD. Estas estrategias son 1) prevenir la formación del péptido Aβ42 en primer lugar; 2) para eliminar el péptido Aβ42 (o los depósitos de amiloide que produce) una vez que se ha formado, y 3) para evitar la interacción entre moléculas de Aβ, evitando de este modo la formación tanto de oligómeros como de agregados fibrilares. Antes de examinar cada una de estas estrategias, podemos considerar cómo los investigadores pueden determinar qué tipo de fármacos pueden tener éxito en la prevención o el tratamiento de la AD.

Uno de los mejores enfoques para el desarrollo de tratamientos para enfermedades humanas es encontrar animales de laboratorio, particularmente ratones, que desarrollen enfermedades similares, y usar estos animales para probar la efectividad de terapias potenciales. Animales que exhiben una enfermedad que imita un padecimiento humano se denomina *modelos animales*.

Por alguna razón, los cerebros de los ratones que envejecen no muestran evidencia de los depósitos de amiloide encontrados en los humanos, y, hasta 1995, no existía un modelo animal para la AD. Luego, en ese año, los investigadores descubrieron que podían crear una cepa de ratones que desarrollaban placas amiloides en el cerebro y funcionaban mal en las tareas que requerían memoria. Crearon esta cepa diseñando genéticamente a los ratones para que porten un gen *APP* humano mutante, uno responsable de causar AD en las familias. Estos ratones genéticamente modificados (*transgénicos*) han demostrado ser muy valiosos para probar terapias potenciales para la AD. La mayor emoción en el campo de la terapéutica AD está centrado en la segunda estrategia mencionada anteriormente, y podemos utilizar estas investigaciones para ilustrar algunos de los pasos requeridos en el desarrollo de un nuevo medicamento.

En 1999, Dale Schenk y colegas de la Farmacéutica Elan publicaron un hallazgo extraordinario. Habían descubierto que la formación de placas amiloides en ratones que portaban el APP humano mutante podía bloquearse inyectando repetidamente a los animales la misma sustancia que causa el problema, el péptido Aß42 agregado. En efecto, los investigadores habían inmunizado (es decir, vacunado) a los ratones contra la enfermedad. Cuando los ratones jóvenes (de seis semanas de edad) fueron inmunizados con Aβ42, no pudieron desarrollar los depósitos de amiloide en el cerebro a medida que crecían. Cuando se inmunizaron ratones mayores (13 meses de edad) cuyos cerebros ya contenían depósitos extensos de amiloide con Aβ42, se eliminó del sistema nervioso una fracción significativa de los depósitos fibrilares. Aún más importante, los ratones inmunizados se desempeñaron mejor que sus compañeros de camada no inmunizados en las pruebas basadas en la memoria.

El éxito dramático de estos experimentos en ratones, combinado con el hecho de que los animales no mostraron efectos negativos del procedimiento de inmunización, llevó a los reguladores del gobierno a aprobar rápidamente un ensayo clínico de fase I de la vacuna Aβ42. La fase I del ensayo clínico es el primer paso en la prueba de un nuevo medicamento o procedimiento en humanos y generalmente viene después de años de pruebas preclínicas en células cultivadas y modelos animales. Las pruebas de fase I se llevan a cabo en un pequeño número de sujetos y están diseñadas para monitorear la seguridad de la terapia y la dosis óptima del medicamento en lugar de su eficacia contra la enfermedad.

Ninguno de los sujetos en dos ensayos de fase I separados de la vacuna Aβ mostró ningún efecto perjudicial a partir de la inyección del péptido amiloide. Como resultado, los investigadores pudieron continuar con un ensayo clínico de fase II, que involucra a un grupo más grande de sujetos y está diseñado para obtener una medida de la efectividad del procedimiento (o medicamento). Este particular ensayo de fase II se llevó a cabo como un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. En este tipo de estudio:

1. Los pacientes se dividen *aleatoriamente* en dos grupos que son tratados de manera similar excepto que a un grupo se le administra el factor curativo (proteína, anticuerpos, fármacos, etc.) que se está investigando y al otro grupo se le administra un placebo (una sustancia inactiva que no tiene valor).
2. El estudio es *doblemente ciego*, lo que significa que ni los investigadores ni los pacientes saben quién está recibiendo tratamiento y quién recibe el placebo.

El ensayo de fase II para la vacuna Aβ comenzó en 2001 y enlistó a más de 350 individuos en Estados Unidos y Europa que habían sido diagnosticados con AD leve a moderada. Después de recibir dos inyecciones de β-amiloide sintético (o un placebo), 6% de los sujetos experimentó una inflamación potencialmente mortal del cerebro. La inflamación en la mayoría de estos pacientes se trató con éxito con esteroides, pero el ensayo se suspendió. Más recientemente, se han llevado a cabo ensayos de vacunación utilizando fragmentos de proteína Aβ que no inducen inflamación, pero los resultados de estos ensayos aún no se conocen.

(*continúa*)

Una vez que se hizo evidente que la vacunación de pacientes con Aβ42 tenía riesgos inherentes, se decidió buscar una forma más segura de terapia de inmunización, que es administrar anticuerpos dirigidos contra Aβ que se han producido fuera del cuerpo. Este tipo de enfoque se conoce como *inmunización pasiva* porque la persona no produce los anticuerpos terapéuticos. La inmunización pasiva con un anticuerpo anti-Aβ42 (llamado bapineuzumab) ya había demostrado ser capaz de restaurar la función de la memoria en ratones transgénicos y rápidamente se demostró que era seguro y aparentemente efectivo en ensayos clínicos de fases I y II. El último paso antes de la aprobación del gobierno es un ensayo de fase III, que generalmente emplea un gran número de sujetos (1 000 o más en varios centros de investigación) y compara la efectividad del nuevo tratamiento con los enfoques estándar. Los primeros resultados de los ensayos de fase III con bapineuzumab se informaron en 2008 y fueron decepcionantes: hubo poca o ninguna evidencia de que el anticuerpo proporcionara beneficios para prevenir la progresión de la enfermedad. Otro anticuerpo conocido como solanezumab, que reconoce una parte diferente de la proteína Aβ, ha sido sujeto de ensayos en fase III en curso y hasta ahora los resultados indican efectividad en la restauración de la función cognitiva en pacientes con síntomas leves de Alzheimer, pero ningún efecto en pacientes con síntomas más severos. Dado el impacto de la AD en la salud humana y la gran cantidad de dinero que podría obtenerse de este tipo de medicamentos, las compañías farmacéuticas están dispuestas a correr el riesgo de que una de estas estrategias inmunológicas muestre algún valor terapéutico.

Mientras tanto, un análisis exhaustivo de algunos de los pacientes que habían sido vacunados con Aβ42 en el ensayo de inmunización original de 2001 también se informó en 2008. El análisis de este grupo de pacientes indicó que la vacuna Aβ42 no había tenido ningún efecto para prevenir la progresión de la enfermedad. Fue particularmente sorprendente que en varios de estos pacientes que habían muerto de demencia severa, prácticamente no quedaban placas de amiloide en sus cerebros. Esta unión sugiere enérgicamente que la eliminación de los depósitos de amiloide en un paciente que ya padece los síntomas de demencia leve a moderada no detiene la progresión de la enfermedad. Estos resultados se pueden interpretar de más de una manera. Una interpretación es que los depósitos de amiloide no son la causa de los síntomas de la demencia. Una interpretación alternativa es que los efectos tóxicos irreversibles de los depósitos ya habían ocurrido antes de que comenzara la inmunización y que era demasiado tarde para revertir el curso de la enfermedad utilizando tratamientos que eliminan los depósitos de amiloide existentes. Es importante señalar, a este respecto, que la formación de depósitos de amiloide en el cerebro comienza 10 o más años antes de que se notifiquen los síntomas clínicos de la enfermedad de Alzheimer. Es posible que, si estos tratamientos hubieran comenzado antes, los síntomas de la enfermedad nunca hayan aparecido. El primer ensayo clínico de este tipo (conocido como "ensayo preventivo") se inició en 2012, ya que varios cientos de individuos que normalmente estarían destinados a desarrollar AD de inicio temprano (debido a mutaciones en el gen *PSEN1*) fueron tratados con un anticuerpo anti-Aβ con la esperanza de bloquear la futura acumulación de amiloide y prevenir la enfermedad. También se han iniciado ensayos adicionales que usan un mayor número de pacientes que no tienen mutaciones predisponentes conocidas de AD, usando el anticuerpo de nueva generación solanezumab. Los ensayos preventivos que evalúan la capacidad de un tratamiento para retrasar el inicio de una enfermedad que normalmente puede demorar décadas en manifestarse naturalmente tardan mucho tiempo en realizarse, por lo que aún no se conocen los resultados.

Claramente, los tratamientos preventivos tienen más sentido para los pacientes que podrían estar a punto de desarrollar una enfermedad. Los recientes avances en los procedimientos de imágenes del cerebro ahora permiten a los médicos observar los depósitos de amiloide en el cerebro de las personas mucho antes de que se hayan desarrollado los síntomas de AD (**FIGURA 4**).

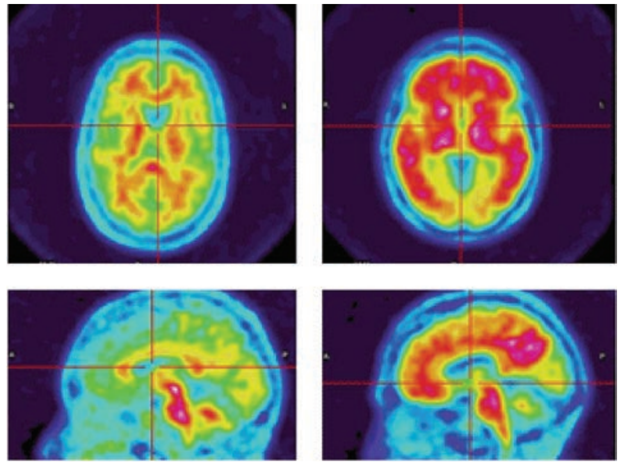


**FIGURA 4 Una técnica de neuroimagen que revela la presencia de amiloide en el cerebro.** Estos escaneos PET (tomografía por emisión de positrones) muestran los cerebros de dos individuos que han ingerido un compuesto radiactivo, llamado flutemetamol, que se une a los depósitos de amiloide y aparece rojo en la imagen. Los paneles de la izquierda muestran un cerebro sano y los paneles de la derecha muestran el cerebro de un paciente con AD, revelando una gran acumulación de amiloide. Los depósitos de amiloide en el cerebro se pueden detectar con esta técnica en personas que no muestran evidencia de disfunción cognitiva. Se presume que tales individuos sin síntomas corren un alto riesgo de desarrollar AD. Aquellos que carecen de tales depósitos pueden considerarse con un riesgo muy bajo de la enfermedad en el futuro cercano.

FUENTE: Cortesía de Ken Garber. *Nature Biotechnology* 2012;30:575. doi: 10.1038/nbt0712-575. Publicado online el 10 de julio de 2012.

Según estos estudios, es posible comenzar tratamientos preventivos en personas que tienen un riesgo muy alto de desarrollar AD antes de que desarrollen síntomas.

También se han desarrollado medicamentos que siguen las otras dos estrategias descritas anteriormente. Alzhemed y *scyllo*-inositol son dos pequeñas moléculas que se unen a Aβ péptidos y bloquean la agregación molecular y la formación de la fibrilla. Los ensayos clínicos no han podido demostrar que ninguno de los fármacos sea eficaz para detener la progresión de la enfermedad en pacientes con AD leve a moderada. La tercera estrategia descrita anteriormente es detener la producción de péptidos Aβ. Esto se puede lograr inhibiendo β- o γ-secretasa, porque se requieren ambas enzimas en la ruta que escinde el precursor de APP para liberar el péptido interno (figura 3). Las compañías farmacéuticas han tenido grandes dificultades para desarrollar un inhibidor de β-secretasa que es a la vez potente y lo suficientemente pequeño como para ingresar al cerebro desde el torrente sanguíneo; sin embargo, uno de esos inhibidores, conocido como MK-8931, se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase III. Se han desarrollado varios inhibidores potentes de la γ-secretasa que bloquean la producción de todos los péptidos Aβ, tanto en células nerviosas cultivadas como en ratones AD transgénicos. Pero hay un problema biológico que debe superarse con esta clase de inhibidores. Además de dividir APP, la actividad de γ-secretasa también se requiere en una señalización clave que implica una proteína llamada Notch. Dos de los inhibidores de γ-secretasa más prometedores, el flurizan y el semagacestat, no han mostrado ningún beneficio para detener la progresión de la AD. Además de su falta de eficacia, el semagacestat causó efectos secundarios adversos que probablemente fueron resultado del bloqueo de la vía Notch. El objetivo de los diseñadores de fármacos es desarrollar un compuesto (p. ej., begacestat) que bloquee la división de APP pero que no interfiera con la escisión de Notch.

Tomada colectivamente, el aparente fracaso de todos estos fármacos, dirigido a varios pasos en la formación de agregados que contienen Aβ y deposición de amiloide, ha dejado al campo de la terapéutica AD sin un plan claro para el futuro. Algunas compañías farmacéuticas continúan desarrollando nuevos me-

dicamentos dirigidos a bloquear la formación de agregados de amiloide, mientras que otros se están moviendo en diferentes direcciones. Estos hallazgos también plantean una pregunta más básica: ¿es el péptido Aβ incluso parte del mecanismo subyacente que conduce a AD? No se ha mencionado, pero Aβ no es la única proteína mal plegada que se encuentra en los cerebros de las personas con AD. Otra proteína llamada tau, que funciona como parte del citoesqueleto de una célula nerviosa (sección 9.2), puede convertirse en haces de filamentos celulares enmarañados llamados ovillos neurofibrilares (o NFT) (figura 2) que interfieren con el movimiento de las sustancias hacia abajo de la longitud de la célula nerviosa. Las NFT se forman cuando las moléculas tau en las células nerviosas se vuelven excesivamente fosforiladas. Se ha descubierto que las mutaciones en el gen que codifica tau causan una forma rara de demencia (llamada FTD), que se caracteriza por la formación de NFT. Por tanto, las NFT se han relacionado con la demencia, pero se han ignorado en gran parte como un factor causante en la patogénesis de la AD, debido principalmente al hecho de que los modelos de ratón transgénicos AD discutidos anteriormente no desarrollan NFT. Si se extrapolan los resultados de estos estudios con ratones a humanos, sugieren que las NFT no son necesarias para el declive cognitivo que ocurre en pacientes con AD. Al mismo tiempo, sin embargo, las utopías de los cerebros de los humanos que murieron de AD sugieren que la carga de NFT o se relaciona mucho mejor con la disfunción cognitiva y la pérdida neuronal que la concentración de placas amiloides. Dado que las mutaciones en los genes de la vía Aβ son claramente una causa de AD, y sin embargo es la carga de NFT la que se correlaciona con el deterioro cognitivo, parece que tanto Aβ como las NFT deben estar involucradas en la etiología de la AD. Muchos investigadores creen que una deposición Aβ de alguna manera conduce a la formación de NFT, una idea conocida como la "hipótesis de la cascada de amiloide", pero el mecanismo por el cual esto podría ocurrir sigue siendo desconocido. De hecho, una de las nuevas drogas más prometedoras en el momento de escribir estas líneas es la que actúa sobre las NFT en lugar del β-amiloide. En este caso, el medicamento cloruro de metiltioninio, que disuelve los NFT, se probó en un grupo de más de 300 pacientes con AD leve a moderada en un ensayo de fase II. Se descubrió que el medicamento reduce el deterioro mental en un periodo de un año en un promedio de 81% en comparación con los pacientes que recibieron un placebo. Una versión modificada del medicamento, conocida como leuco metiltioninio, ahora se está probando en estudios de fase III mayores para AD y FTD, pero los resultados aún no están disponibles. Otros compuestos que inhiben una de las enzimas (GSK-3) que agrega grupos fosfato a la proteína tau también están siendo investigados como agentes terapéuticos de AD. Los ensayos clínicos de un inhibidor de GSK-3, valproato, se han detenido debido a los efectos adversos. (Los resultados de los estudios sobre estos y otros tratamientos pueden examinarse en www.alzforum.org/dis/tre/drc).

Es evidente a partir de esta discusión que una gran cantidad de trabajo en AD se ha basado en ratones transgénicos que portan genes AD humanos. Estos animales han servido como los principales sujetos preclínicos para la prueba de drogas AD, y se han utilizado ampliamente en la investigación básica que tiene como objetivo comprender los mecanismos de la enfermedad responsables del desarrollo de la AD. Pero se han planteado muchas preguntas sobre la precisión con que estos modelos animales imitan la enfermedad en humanos, particularmente los casos humanos esporádicos en los cuales las personas afectadas carecen de los genes mutantes que causan que los animales desarrollen el trastorno correspondiente.

# 2.14 VÍAS EXPERIMENTALES

## Las proteínas que ayudan a los chaperones alcanzan su estado plegado correcto

En 1962, FM Ritossa, un biólogo italiano que estudiaba el desarrollo de la mosca de la fruta *Drosophila*, informó un hallazgo curioso.[1] Cuando la temperatura a la que se desarrollaban las larvas de la mosca de la fruta se elevó de los 25 °C normales a 32°C, se activaron varios sitios nuevos en los cromosomas gigantes de las células de las larvas. Como veremos en el capítulo 10, los cromosomas gigantes de estas larvas de insectos proporcionan una exhibición visual de la expresión génica (véase figura 10-8). Los resultados sugirieron que el aumento de la temperatura indujo la expresión de nuevos genes, un hallazgo que se confirmó una década más tarde con la caracterización de varias proteínas que aparecieron en las larvas después de la elevación de la temperatura[2]. Pronto se descubrió que esta respuesta, llamada **respuesta de choque térmico**, no estaba confinada a las moscas de la fruta, sino que puede iniciarse en muchas células diferentes de prácticamente cualquier tipo de organismo, desde bacterias hasta plantas y mamíferos. Un examen más detallado reveló que las proteínas producidas durante la respuesta se encontraron no solo en células con choque térmico, sino también a menor concentración en células en condiciones normales. ¿Cuál es la función de estas llamadas *proteínas de choque térmico* (*hsps*)? La respuesta a esta pregunta fue revelada gradualmente por una serie de estudios aparentemente no relacionados.

Veremos en la página 79 que algunas estructuras complejas de múltiples subunidades, como un ribosoma bacteriano o una partícula del virus del mosaico del tabaco, pueden autoensamblarse a partir de subunidades purificadas. Se demostró en la década de 1960 que las proteínas que componen las partículas de bacteriófago (véase figura 1.22*c*) también poseen una notable capacidad para autoensamblarse, pero generalmente no pueden formar una partícula de virus completa y funcional por sí mismos *in vitro*. Los experimentos sobre ensamblaje de fagos en células bacterianas confirmaron que los fagos requieren ayuda bacteriana. Se demostró en 1973, por ejemplo, que una determinada cepa de bacterias mutantes, llamada *GroE*, no podía soportar el ensamblaje de fagos normales. Dependiendo del tipo de fago, la cabeza o la cola de la partícula del fago se ensambló incorrectamente.[3,4] Estos estudios sugirieron que una proteína codificada por el cromosoma bacteriano participó en el ensamblaje de virus, a pesar de que esta proteína hospedadora no era un componente de las partículas finales del virus. Debido a que obviamente no evolucionó como una ayuda para el ensamblaje del virus, la proteína bacteriana requerida para el ensamblaje del fago tuvo que desempeñar algún papel en las actividades normales de la célula, pero el papel exacto permaneció oscuro. Estudios posteriores revelaron que el sitio del *GroE* en el cromosoma bacteriano en realidad contiene dos genes separados, *GroEL* y *GroES*, que codifican dos proteínas separadas *GroEL* y *GroES*. Bajo el microscopio electrónico, la proteína *GroEL* purificada apareció como un conjunto cilíndrico que consta de dos discos. Cada disco estaba compuesto por siete subunidades dispuestas simétricamente alrededor del eje central (**FIGURA 1**).[5,6]

Varios años después, un estudio sobre plantas de guisantes insinuó la existencia de una proteína similar que promueve el en-

(*continúa*)

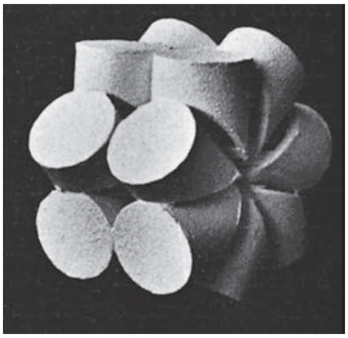


**FIGURA 1 Un modelo inicial del complejo GroEL construido según los datos de la microscopía electrónica y la determinación del peso molecular.** Se ve que el complejo consta de dos discos, cada uno compuesto de siete subunidades idénticas dispuestas simétricamente alrededor de un eje central. Estudios posteriores mostraron que el complejo contiene dos cámaras internas.

FUENTE: Tomada de T. Hohn y otros, *J. Mol. Biol*. 129: 371, © 1979, con la autorización de Elsevier.

samblaje en los cloroplastos de las plantas.[7] Rubisco es una gran proteína en cloroplastos que cataliza la reacción en la que las moléculas de $CO_2$ tomadas de la atmósfera se unen covalentemente a moléculas orgánicas durante la fotosíntesis (sección 6.9). La rubisco comprende 16 subunidades: ocho subunidades pequeñas (masa molecular de 14 000 daltones) y ocho subunidades grandes (55 000 daltones). Se descubrió que las subunidades grandes de rubisco, sintetizadas en el interior del cloroplasto, no están presentes en un estado independiente, sino que están asociadas a un gran ensamblaje de proteínas que consiste en subunidades idénticas de 60 000 daltones (60 kDa) de masa molecular. En su artículo, los investigadores consideraron la posibilidad de que el complejo formado por las grandes subunidades de las rubisco y los polipéptidos de 60 kDa fuera un intermedio en el ensamblaje de una molécula completa de rubisco.

Una línea de investigación separada en células de mamíferos también reveló la existencia de proteínas que parecían ayudar al ensamblaje de proteínas con múltiples subunidades. Al igual que rubisco, las moléculas de anticuerpos consisten en un complejo de dos tipos diferentes de subunidades, más pequeñas cadenas ligeras y cadenas pesadas más grandes. Del mismo modo que las grandes subunidades de rubisco se asocian con otra proteína que no se encuentra en el complejo final, también lo hacen las cadenas pesadas de un complejo de anticuerpos.[8] Esta proteína, que se asocia con cadenas pesadas recién sintetizadas, pero no con cadenas pesadas que ya están unidas a cadenas ligeras, se denominó *proteína de unión*, o BiP. Posteriormente se encontró que BiP tenía una masa molecular de 70 000 daltones (70 kDa).

Hasta este momento hemos estado discutiendo dos líneas de investigación: una relacionada con la respuesta al choque térmico y la otra con proteínas que promueven el ensamblaje de proteínas. Estos dos campos se unieron en 1986, cuando se demostró que una de las proteínas que figuraba más prominentemente en la respuesta al choque térmico, una proteína que había sido llamada *proteína de choque térmico 70 (hsp70)* debido a su masa molecular, era idéntico a BiP, la proteína implicada en el ensamblaje de moléculas de anticuerpos.[9]

Incluso antes del descubrimiento de la respuesta al choque térmico, se sabía que la estructura de las proteínas era sensible a la temperatura, con un pequeño aumento de la temperatura que causaba que estas delicadas moléculas comenzaran a desarrollarse. El despliegue expone residuos hidrofóbicos que fueron enterrados previamente en el núcleo de la proteína. Del mismo modo que las moléculas de grasa en un tazón de sopa se juntan en gotitas, también lo hacen las proteínas con manchas hidrófobas en su superficie. En consecuencia, cuando una célula se ve afectada por el calor, las proteínas solubles se desnaturalizan y forman agregados. Un informe en 1985 demostró que, después de la elevación de la temperatura, las moléculas hsp70 recién sintetizadas ingresan en los núcleos celulares y se unen a agregados de proteínas nucleares, donde actúan como palancas moleculares para promover la desagregación.[10] Debido a su papel en ayudar al ensamblaje de proteínas mediante la prevención de interacciones indeseables, hsp70 y moléculas relacionadas se denominaron **chaperonas moleculares**.[11]

Pronto se demostró que la proteína bacteriana de choque térmico GroEL y la proteína ensambladora de rubisco en las plantas eran proteínas homólogas. De hecho, las dos proteínas comparten los mismos aminoácidos en casi la mitad de los más de 500 residuos en sus respectivas moléculas.[12] El hecho de que las dos proteínas, ambos miembros de la *familia de chaperonas Hsp60*, hayan retenido tantos de los mismos aminoácidos, refleja su función similar y esencial en los dos tipos de células. Pero, ¿cuál fue esa función esencial? En este punto, se pensó que su función principal era mediar el ensamblaje de complejos multisubunidad, como rubisco. Esta visión fue cambiada en 1989 por experimentos que estudiaban chaperones moleculares en las mitocondrias por Arthur Horwich de la Universidad de Yale y F.-Ulrich Hartl, Walter Neupert y sus colegas de la Universidad de Munich.[13,14] Se sabía que las proteínas mitocondriales recién producidas en el citosol debían cruzar las membranas mitocondriales externas en una forma monomérica desplegada, extendida. Se encontró un mutante que alteró la actividad de otro miembro de la familia de chaperones Hsp60 que residía dentro de las mitocondrias. En las células que contienen esta chaperona mutante, las proteínas que se transportaron a las mitocondrias no se plegaron en sus formas activas. Incluso las proteínas que consistían en una única cadena polipeptídica no se plegaban en su conformación nativa. Este hallazgo cambió la percepción de la función de chaperona de la noción de que ayudan al ensamblaje de las subunidades ya plegadas en complejos más grandes, hasta nuestro entendimiento actual de que ayudan al plegamiento de la cadena polipeptídica dentro de los confines abarrotados de la célula.

Los resultados de estos y otros estudios indicaron la presencia en las células de al menos dos familias principales de chaperonas moleculares: las chaperonas Hsp70, como BiP, y las chaperonas Hsp60 (que también se llaman *chaperoninas*), como Hsp60, GroEL y la proteína de ensamblaje de rubisco. Nos centraremos en las chaperoninas Hsp60, como GroEL, que se entienden mejor.

Como se reveló por primera vez en 1979, GroEL es un gran complejo molecular de 14 subunidades polipeptídicas dispuestas en dos anillos apilados que se asemejan a una doble rosquilla.[5,6] Quince años después de que se tomaron estas primeras micrografías electrónicas, la estructura tridimensional del complejo GroEL se determinó mediante cristalografía de rayos X.[15] El estudio reveló la presencia de una cavidad central dentro del cilindro GroEL. Estudios posteriores demostraron que esta cavidad estaba dividida en dos cámaras separadas. Cada cámara estaba situada dentro del centro de uno de los anillos del complejo GroEL y era suficientemente grande para encerrar a un polipéptido sometido a plegamiento.

Los estudios de microscopía electrónica también proporcionaron información sobre la estructura y función de una segunda proteína, GroES, que actúa en conjunto con GroEL. Al igual que GroEL, GroES es una proteína anular con siete subunidades dispuestas simétricamente alrededor de un eje central. GroES, sin embargo, consta de un solo anillo, y sus subunidades son mucho más pequeñas (10 000 daltones) que las de GroEL (60 000 daltones). GroES se ve como una tapa o domo que encaja en la parte superior de cualquier extremo de un cilindro GroEL (**FIGURA 2**). La unión de GroES a un extremo de GroEL provoca un cambio conformacional dramático en la proteína GroEL que aumenta marcadamente el volumen de la cámara cerrada en ese extremo del complejo.[16]

La importancia de este cambio conformacional ha sido revelada con notable detalle por los estudios de cristalografía de rayos X en los laboratorios de Arthur Horwich y Paul Sigler en la Universidad de Yale.[17] Como se muestra en la **FIGURA 3**, la unión de la tapa GroES está acompañada por una rotación de 60° del dominio apical (rojo) de las subunidades que forman el anillo

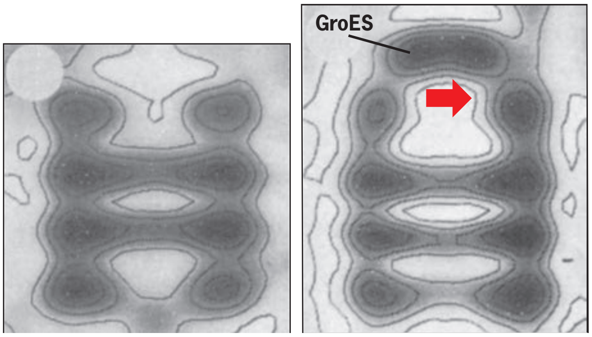



**FIGURA 2 Reconstrucciones de GroEL basadas en micrografías electrónicas de alta resolución tomadas de muestras que se habían congelado en etano líquido y se habían examinado a –170 °C.** La imagen de la izquierda muestra el complejo GroEL, y la de la derecha muestra el complejo GroEL con GroES, que aparece como una cúpula en un extremo del cilindro. Es evidente que la unión de GroES va acompañada de un marcado cambio en la conformación del extremo apical de las proteínas que forman el anillo GroEL superior (flecha), lo que da como resultado una notable ampliación de la cámara superior.

FUENTE: Tomada de S Chen, *et al*. Cortesía de Helen R. Saibil, *Nature* 1994;371:263. Reimpresa con autorización de Macmillan Publishers Limited.

GroEL en ese extremo del cilindro GroEL. La unión de GroES hace más que desencadenar un cambio conformacional que amplía la cámara GroEL. Antes de la fijación de GroES, la pared interna de la cámara GroEL tiene residuos hidrofóbicos expuestos que le dan al revestimiento un carácter hidrofóbico.

Los polipéptidos no nativos también tienen residuos hidrofóbicos expuestos que se entierran en el interior del polipéptido nativo. Como las superficies hidrofóbicas tienden a interactuar, el revestimiento hidrofóbico de la cavidad GroEL se une a la superficie de polipéptidos no nativos. La unión de GroES a GroEL entierra los residuos hidrofóbicos de la pared GroEL y expone una serie de residuos polares, lo que cambia el carácter de la pared de la cámara. Como resultado de este cambio, un polipéptido no nativo que se había unido a la pared de GroEL por interacciones hidrofóbicas se desplaza al espacio dentro de la cámara. Una vez liberado de su unión a la pared de la cámara, el polipéptido tiene la oportunidad de continuar su plegado en un entorno protegido. Después de aproximadamente 15 segundos, la tapa GroES se disocia del anillo GroEL, y el polipéptido se expulsa de la cámara. Si el polipéptido no ha alcanzado su conformación nativa en el momento en que se expulsa, puede volver a unirse al mismo u otro GroEL, y el proceso se repite. En la **FIGURA 4** se muestra un modelo que representa algunos de los pasos que se cree que ocurren durante el plegado asistido por GroEL-GroES.

Aproximadamente 250 de las aproximadamente 2 400 proteínas presentes en el citosol de la célula *E. coli* normalmente interactúan con GroEL.[18] ¿Cómo es posible que una chaperona se una a tantos polipéptidos diferentes? El sitio de unión de GroEL consiste en una superficie hidrofóbica formada en gran parte por dos hélices α del dominio apical que es capaz de unirse virtualmente a cualquier secuencia de residuos hidrofóbicos que puedan ser accesibles en un polipéptido parcialmente plegado o mal plegado.[19] Una comparación de la estructura cristalina de la molécula GroEL no unida con la de GroEL unido a varios péptidos diferentes reveló que el sitio de unión en el dominio apical de una subunidad GroEL puede ajustar localmente su posicionamiento cuando está unido a diferentes compañeros. Este hallazgo indica que el sitio de unión tiene flexibilidad estructural que le permite ajustar su apariencia para adaptarse a la forma del polipéptido particular con el que tiene que interactuar.

Varios estudios también han sugerido que GroEL hace más que simplemente proporcionar una cámara pasiva en la que las proteínas pueden plegarse sin interferencia externa. En un estudio se utilizó la mutagénesis dirigida al sitio para modificar un residuo clave, Tyr71 de GroES, cuya cadena lateral cuelga del

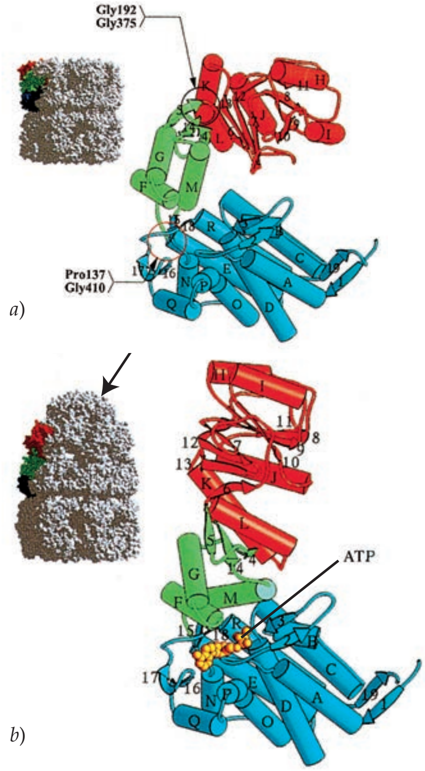



**FIGURA 3 Cambio conformacional en GroEL.** *a*) El modelo de la izquierda muestra una vista de la superficie de los dos anillos que componen la chaperonina GroEL. El dibujo de la derecha muestra la estructura terciaria de una de las subunidades del anillo GroEL superior. Se puede ver que la cadena polipeptídica se pliega en tres dominios. *b*) Cuando un anillo GroES (flecha) se une al cilindro GroEL, el dominio apical de cada subunidad GroEL del anillo adyacente sufre una rotación dramática de aproximadamente 60° con el dominio intermedio (que se muestra en verde) que actúa como una bisagra. El efecto de este cambio en partes del polipéptido es una elevación marcada de la pared GroEL y la ampliación de la cámara cerrada.

FUENTE: De Z. Xu, A. L. Horwich y P. B. Sigler. *Nature* 1997;388: 744. © 1997, reimpreso con autorización de Macmillan Publishers, Limited.

techo de la cámara de plegado.[20] Debido a su anillo aromático, la tirosina es un residuo moderadamente hidrofóbico (figura 2-26). Cuando Tyr71 fue reemplazado por un aminoácido con carga positiva o negativa, la variante GroEL-GroES resultante exhibió una capacidad incrementada para ayudar al plegamiento de un polipéptido extraño específico, la proteína fluorescente verde (GFP). Sin embargo, las sustituciones de Tyr71 que mejoraron la capacidad de GroES-GroEL para aumentar el plegamiento de GFP hicieron que la chaperonina fuera menos competente para ayudar a sus sustratos naturales a plegarse. Por tanto, a medida que la chaperonina se volvió cada vez más especializada para interactuar con GFP, perdió su capacidad general para ayudar al plegamiento de proteínas que tienen una estructura no relacionada. Este hallazgo sugiere que los aminoácidos individuales en la pared de la cámara de plegamiento pueden participar de alguna manera en la reacción de plegamiento. Los datos de otro estudio han sugerido que la unión de una proteína no nativa a GroEL es seguida por un despliegue forzado de la proteína del sustrato.[21] La FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) es una técnica (discutida en la sección 18.3) que permite a los investigadores determinar la distancia entre diferentes partes de una molécula de proteína en distintos momentos durante un proceso determinado. En este estudio, los investigadores encontraron que la proteína sometida a plegamiento, en este caso rubisco, se unía al dominio apical del anillo GroEL en un estado relativamente compacto. La naturaleza compacta de la proteína unida se reveló por la proximidad entre sí de las etiquetas FRET, que se unieron a los aminoácidos ubicados en

(*continúa*)

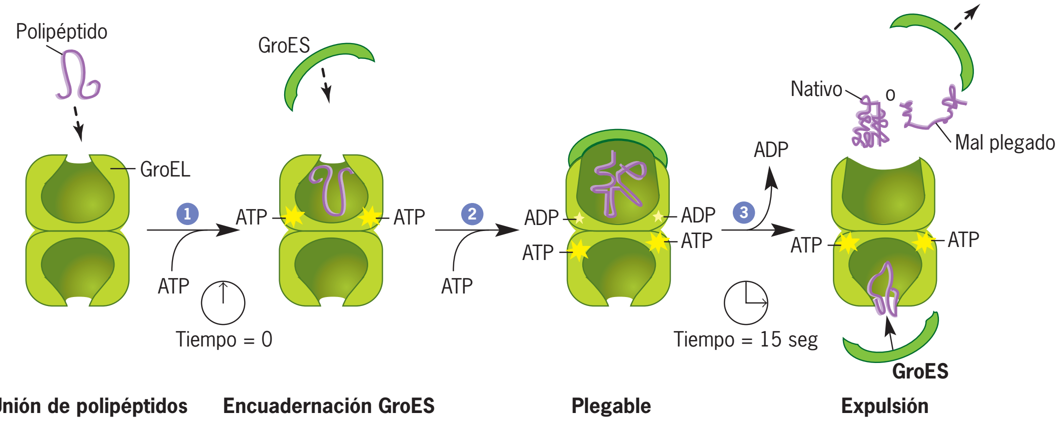



**FIGURA 4 Una ilustración esquemática de los pasos propuestos que se producen durante el plegamiento de un polipéptido asistido por GroEL-GroES.** Se considera que GroEL consta de dos cámaras que tienen estructuras y funciones equivalentes y que se alternan en actividad. Cada cámara está ubicada dentro de uno de los dos anillos que componen el complejo GroEL. El polipéptido no nativo entra en una de las cámaras (paso 1) y se une a sitios hidrofóbicos en la pared de la cámara. La unión de la tapa de GroES produce un cambio conformacional en la pared de la cámara superior, provocando la ampliación de la cámara y la liberación del polipéptido no nativo de la pared al espacio encapsulado (paso 2). Después de que hayan transcurrido aproximadamente 15 segundos, el GroES se disocia del complejo y el polipéptido se expulsa de la cámara (paso 3). Si el polipéptido ha alcanzado su conformación nativa, al igual que la molécula de la izquierda, el proceso de plegamiento está completo. Sin embargo, si el polipéptido está solo parcialmente plegado o mal plegado, volverá a enlazar la cámara GroEL para otra ronda de plegamiento. (*Nota:* Como se indicó, el mecanismo de acción de GroEL está impulsado por la unión e hidrólisis del ATP, una molécula rica en energía cuya función se analiza detenidamente en el siguiente capítulo).

FUENTE: AL.Horwich, *et al*. *Proc Nat'l Acad Sci* USA 1999;96:11037.

los extremos opuestos de la cadena de rubisco. Luego, durante el cambio conformacional que agranda el volumen de la cavidad GroEL (figura 3), la proteína rubisco unida se desplegó a la fuerza, como lo demuestra la distancia incrementada entre los dos extremos marcados de la molécula. Este estudio sugiere que el polipéptido rubisco se toma completamente de nuevo al estado desplegado, donde se le da la oportunidad de replegar desde cero. Esta acción debería ayudar a prevenir que la proteína no nativa quede atrapada permanentemente en un estado mal plegado. En otras palabras, cada visita individual a una cámara GroEL-GroES proporciona un intento total o inexistente de alcanzar el estado nativo, en lugar de solo una etapa en una serie de pasos en los que la proteína se acerca al estado nativo con cada ronda de plegado. Las revisiones recientes de chaperones moleculares se pueden encontrar en las referencias 22-23.

Téngase en cuenta que los chaperones moleculares no transmiten información para el proceso de plegado, sino que evitan que las proteínas se desvíen de su camino de plegado correcto y se encuentren en estados plegados o agregados incorrectamente. Al igual que Anfinsen descubrió hace décadas, la estructura tridimensional de una proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos.

## Referencias

1. Ritossa, F. A. new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experentia* 1962;18:571-573.
2. Tissieres A., Mitchell H. K., & Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosomal puffs. *J. Mol Biol* 1974;84:389–398.
3. Sternberg N. Properties of a mutant of *Escherichia coli* defective in bacteriophage lambda head formation (groE). *J. Mol Biol* 1973;76:1-23.
4. Georgopoulos C. P., *et al*. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J Mol Biol* 1973;76:45-60.
5. Hohn T., *et al.* Isolation and characterization of the host protein groE involved in bacteriophage lambda assembly. *J Mol Biol* 1979;129:359–373.
6. Hendrix R. W. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol Biol* 1979; 129: 375-392.
7. Barrowclough R. & Ellis R. J. Protein synthesis in chloroplasts. IX. *Biochim Biophys Acta* 1980;608:19-31.
8. Haas I. G. y Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 1983;306:387-389.
9. Munro S. y Pelham HRB. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kD glucose-regulated protein and immunoglobin heavy chain binding protein. *Cell* 1986;46:291-300.
10. Lewis M. J. y Pelham HRB. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70kD heat-shock protein. *EMBO J* 1985;4:3137-3143.
11. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 1987;328: 378-379.
12. Hemmingsen S. M., *et al*. Homologous plant and bacterial pro-teins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 1988;333: 330-334.
13. Cheng M. Y., *et al*. Mitochondrial heat-shock protein Hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 1989;337:620-625.
14. Ostermann J., *et al*. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 1989;341: 125-130.
15. Braig K., *et al*. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8A. *Nature* 1994;371:578–586.
16. Chen S., *et al*. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes. *Nature* 1994;371:261– 264.
17. Xu Z., Horwich A. L., y Sigler P. B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-$(ADP)_7$ chaperonin complex. *Nature* 1997; 388:741-750.
18. Kerner M. J., *et al*. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* 2005;122: 209-220.
19. Chen L. y Sigler P. The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* 1999;99: 757-768.
20. Wang J. D., *et al*. Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. *Cell* 2002;111:1027-1039.
21. Lin Z., *et al*. Stimulates protein folding through forced unfolding. *Nature Struct Mol Biol* 2008;15:303-311.
22. Rothman J. E. y Schekman R. Molecular mechanisms of protein folding in the cell. *Cell* 2011;146:851-854.
23. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding, and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013;14:630-642.

## 2.15 Proteómica e interactómica

Con toda la atención puesta en la secuenciación del genoma en los últimos años, es fácil perder de vista el hecho de que los genes son principalmente unidades de almacenamiento de información, mientras que las proteínas organizan las actividades celulares. La secuenciación del genoma proporciona una especie de "lista de partes". El genoma humano probablemente contenga entre 20 000 y 22 000 genes, cada uno de los cuales puede originar una variedad de proteínas diferentes.[5] Hasta la fecha, solo se ha caracterizado una fracción de estas moléculas.

### Proteómica

El inventario completo de proteínas que produce un organismo, ya sea humano o no, se conoce como el **proteoma** de ese organismo. El término *proteoma* también se aplica al inventario de todas las proteínas que están presentes en un tejido específico, célula u organelo celular. Debido al gran número de proteínas que se están estudiando actualmente, los investigadores han tratado de desarrollar técnicas que les permitan determinar las propiedades o actividades de un gran número de proteínas en un solo experimento. Un nuevo término, la **proteómica**, fue acuñado para describir el campo en expansión de la bioquímica de proteínas. Este término conlleva el concepto de que las tecnologías avanzadas y las computadoras de alta velocidad se utilizan para realizar estudios a gran escala en diversas matrices de proteínas. Este es el mismo enfoque básico que ha demostrado ser tan exitoso durante la última década en el estudio de los genomas. Pero el estudio de la proteómica es inherentemente más difícil que el estudio de la genómica porque las proteínas son más difíciles de trabajar que el DNA. En términos físicos, un gen es prácticamente el mismo que todos los demás genes, mientras que cada proteína tiene propiedades químicas y requisitos de manejo únicos. Además, pequeñas cantidades de un segmento de DNA particular se pueden expandir en gran medida utilizando enzimas fácilmente disponibles, mientras que las cantidades de proteína no se pueden aumentar. Esto es particularmente problemático cuando se considera que muchas de las proteínas que regulan procesos celulares importantes están presentes en solo un puñado de copias por célula.

Tradicionalmente, los bioquímicos de proteínas han tratado de responder una serie de preguntas sobre proteínas particulares. Estos incluyen: ¿Qué actividad específica demuestra la proteína *in vitro*, y cómo esta actividad ayuda a una célula a llevar a cabo una función particular, como la locomoción celular o la replicación del DNA? ¿Cuál es la estructura tridimensional de la proteína? ¿Cuándo aparece la proteína en el desarrollo del organismo y en qué tipo de células? ¿Dónde en la celda está localizado? ¿La proteína se modifica después de la síntesis mediante la adición de grupos químicos (p. ej., fosfatos o azúcares) y, de ser así, cómo modifica esto su actividad? ¿Qué cantidad de proteína está presente y cómo? ¿Cuánto tiempo sobrevive antes de ser degradada? ¿El nivel de la proteína cambia durante las actividades fisiológicas o como resultado de la enfermedad? ¿Con qué otras proteínas de la célula interactúa? Los biólogos han intentado responder estas preguntas durante décadas, pero, en su mayor parte, lo han estado haciendo una proteína a la vez. Los investigadores de proteómica intentan responder preguntas similares en una escala más completa usando técnicas de gran escala (o *de alto rendimiento*) para catalogar la gran variedad de proteínas producidas por una célula particular.

La tecnología clave en proteómica es la espectrometría de masas, un método para investigar la estructura química de una muestra desconocida. Como se analiza con más detalle en la sección 18.15, la espectrometría de masas es una técnica para determinar la masa precisa de una molécula o fragmento de una molécula, que luego puede utilizarse para identificar esa molécula. Supongamos que quisiéramos identificar una proteína desconocida que tenemos en un tubo de ensayo. La proteína se digiere primero en péptidos con la enzima tripsina. Cuando estos péptidos se introducen en un espectrómetro de masas, se convierten en iones gaseosos y se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Los resultados se muestran como una serie de picos de relación m/z conocida, como la que se muestra en la **FIGURA 2-47**. El patrón de picos constituye una huella digital de masa de *péptido altamente característica* de esa proteína. Pero, ¿cómo se puede identificar una proteína en función de su huella digital de masa peptídica?

La respuesta proviene de la genómica. Una vez que se ha secuenciado un genoma, se pueden predecir las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas. Esta lista de "proteínas virtuales" puede someterse luego a una digestión teórica con tripsina y las masas de los péptidos virtuales resultantes se calculan

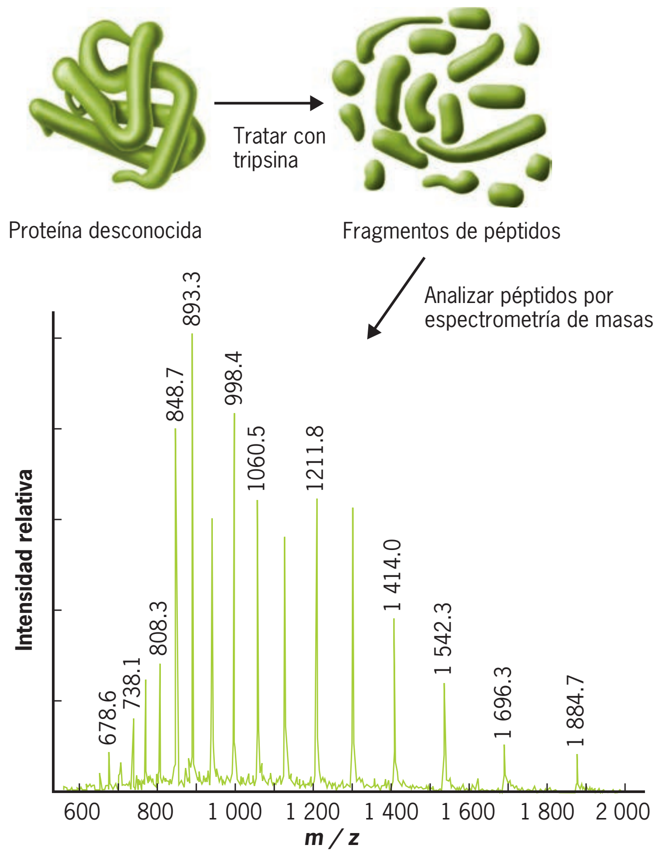



**FIGURA 2-47 Identificación de proteínas por espectrometría de masas.** Se aisló una proteína de una célula u otra muestra y se sometió a digestión con la enzima tripsina. Los fragmentos peptídicos se introducen luego en un espectrómetro de masas donde se ionizan y separan según su relación masa/carga (m/z). Los péptidos separados aparecen como un patrón de picos cuya relación m/z precisa está indicada. Una comparación de estas proporciones con las obtenidas mediante un resumen teórico de proteínas virtuales codificadas por el genoma permite a los investigadores identificar la proteína que se estudia. En este caso, el espectro MS es el de la mioglobina equina que carece de su grupo hem.

FUENTE: Datos reimpresos de J. R. Yates, *Methods Enzymol* 1996; 271:353. Copyright 1996, con autorización de Elsevier.

[5] Hay varias maneras en que un solo gen puede dar lugar a más de un polipéptido. Dos de los mecanismos más destacados, el empalme alternativo y la modificación postraduccional, se discuten en otras secciones del texto. También se puede observar que muchas proteínas tienen más de una función distinta. Incluso la mioglobina, que durante mucho tiempo se ha estudiado como una proteína de almacenamiento de oxígeno, recientemente se ha demostrado que está implicada en la conversión del óxido nítrico (NO) en nitrato ($NO_3^-$).

y se ingresan en una base de datos. Una vez que se ha hecho esto, las masas de péptidos reales de una proteína purificada obtenida por el espectrómetro de masas se pueden comparar usando una computadora para las masas predichas por digestiones teóricas de todos los polipéptidos codificados por el genoma. En la mayoría de los casos, la proteína que ha sido aislada y sometida a espectrometría de masas puede identificarse directamente en base a este tipo de búsqueda en la base de datos. Los espectrómetros de masas no están restringidos a la manipulación de una proteína purificada a la vez, sino que también son capaces de analizar proteínas presentes en mezclas complejas (sección 18.15). Al analizar la proteína total extraída de una célula mediante espectrometría de masas, es posible determinar una lista de todas las proteínas presentes en la célula. Esta lista se conoce como el proteoma de la célula. Los estudios proteómicos son particularmente útiles cuando se comparan dos muestras diferentes para ver cómo la composición de la proteína cambia con el tiempo. Por ejemplo, el proteoma puede analizarse antes y después de la secreción de una hormona dentro del cuerpo, después de tomar un medicamento o durante una enfermedad particular. Los cambios en la abundancia de diferentes proteínas durante tales transiciones pueden proporcionar pistas valiosas sobre cómo la función celular está cambiando en una situación dada.

La proteómica está desempeñando un papel cada vez más importante en el avance de la práctica de la medicina. Se cree que la mayoría de las enfermedades humanas dejan patrones reveladores (o *biomarcadores*) entre las miles de proteínas presentes en la sangre u otros fluidos corporales. La forma más sencilla de determinar si una proteína de biomarcador particular característica de una enfermedad está presente en una muestra de sangre u orina, y qué cantidad de esa proteína está presente, es medir la interacción de la proteína con un anticuerpo específico. Esta es la base, por ejemplo, de la prueba de PSA utilizada en la detección sistemática de cáncer de próstata en hombres. El PSA es una proteína que se encuentra en la sangre de hombres normales, pero está presente en niveles elevados en personas con cáncer de próstata. Los niveles de PSA se determinan midiendo la cantidad de proteína en la sangre que se une a los anticuerpos anti-PSA. El obstáculo más desafiante para desarrollar este tipo de prueba diagnóstica es saber qué proteína actuará como el biomarcador más confiable. Aquí es donde la proteómica entra en juego. Se han realizado muchos esfuerzos para comparar las proteínas presentes en la sangre de individuos sanos con los presentes en la sangre de personas que padecen diversas enfermedades, especialmente cáncer. Inicialmente, los resultados de estas búsquedas de biomarcadores no eran confiables porque los resultados de un grupo de investigación no podían duplicarse por los esfuerzos de otros grupos. La principal dificultad proviene del hecho de que el suero sanguíneo humano es una solución tan compleja que contiene miles de proteínas que varían en abundancia en 9 o 10 órdenes de magnitud. Pero a medida que mejora la tecnología de espectrometría proteómica y de masas, la información sobre muestras complejas se vuelve más rica y rica. Ya, la proteómica se ha utilizado para revelar biomarcadores importantes para la enfermedad. Por ejemplo, la prueba de sangre OVA1 para el cáncer de ovario, que detecta una colección de biomarcadores usando pruebas basadas en anticuerpos, se inventó usando datos del análisis proteómico de un gran número de muestras de pacientes. La prueba OVA1 se usa principalmente para cánceres que ya han sido detectados, con el fin de proporcionar más información sobre el tumor antes de la cirugía. Se espera que, un día, sea posible usar un único análisis de sangre para revelar la existencia de una enfermedad cardiaca, hepática o renal en etapa temprana que se puede tratar antes de que se convierta en una condición que ponga en peligro la vida.

La separación de proteínas y las técnicas de espectrometría de masas no nos dicen nada sobre la función de una proteína. Los investigadores han estado trabajando para diseñar técnicas que permitan determinar la función de la proteína a gran escala, en lugar de una proteína a la vez. Varias nuevas tecnologías se han desarrollado para cumplir esta misión; lo haremos considerando solo uno: el uso de pantallas de interferencia de RNA (RNAi) en todo el genoma. El RNAi es un proceso celular mediante el cual las células producen RNA pequeños (llamados siRNA) que se unen a mRNA específicos e inhiben la traducción de estos mRNA en proteínas. Este fenómeno y su uso se discuten en detalle en las secciones 11.10 y 18.25. Para el presente propósito, simplemente señalaremos que los investigadores pueden sintetizar una colección (biblioteca) de siRNA que son capaces de inhibir la traducción de prácticamente cualquier mRNA que sea producido por un genoma. Cada mRNA representa la expresión de un gen específico que codifica una proteína particular; por tanto, uno puede descubrir qué proteínas están involucradas en un proceso celular particular determinando qué siRNA interfieren con ese proceso. El RNAi puede usarse en pantallas a gran escala de todo el genoma y también se puede usar para probar la función de genes individuales o conjuntos de genes. La combinación de RNAi con proteómica es extremadamente poderosa. Tan pronto como un análisis proteómico sugiere que el nivel de una proteína particular cambia durante un proceso de interés, la expresión de esa proteína puede ser bloqueada por un siRNA apropiado para preguntar si su función es relevante para ese proceso.

## Interactómica

La mayoría de los investigadores que estudian las interacciones proteína-proteína quieren saber si una proteína con la que están trabajando, la llaman proteína X, interactúa físicamente con otra proteína, la llaman proteína Y. Se pueden usar varias técnicas para probar una interacción entre cualquier par particular de proteínas, como se discutió en la sección 18.12. Sin embargo, en los últimos años, varios equipos de investigación se han propuesto estudiar las interacciones proteína-proteína a escala global. Por ejemplo, uno podría querer conocer todas las interacciones que ocurren entre las aproximadamente 6 000 proteínas codificadas por el genoma de la levadura en gemación *Saccharomyces cerevisiae*. Como es cierto para un número creciente de organismos, el genoma completo de esta levadura se ha secuenciado, y prácticamente cada gen dentro del genoma está disponible como un segmento de DNA individual que puede clonarse y usarse según se desee. Las pruebas de posibles interacciones entre todas estas proteínas requieren métodos que los robots puedan automatizar y realizar fácilmente, pero que también sean lo suficientemente confiables y sensibles como para detectar la mayoría de las interacciones reales sin producir demasiadas interacciones falsas en el proceso. Uno de esos métodos que ha sido ampliamente adoptado es la espectrometría de masas TAP-tag. En este enfoque, el DNA de un gen de interés se fusiona con DNA que codifica una etiqueta de proteína llamada etiqueta TAP que se purifica fácilmente usando métodos de cromatografía de afinidad (véase “el video **Guía experimental: purificación de proteínas usando la etiqueta TAP” y el capítulo 18**). Este gen etiquetado con TAP se expresa en una célula y luego la célula se abre y la proteína marcada con TAP se purifica, portando cualquier proteína que interactúe con ella. Los conjuntos de proteínas que se copurifican con la proteína marcada con TAP luego se identifica por espectrometría de masas como en la figura 2-47. Este proceso se repite para cada gen en el genoma, produciendo finalmente un mapa que muestra todas las proteínas que se copurifican entre sí y, por tanto, presumiblemente interactúan dentro de la célula. Este conjunto completo de interacciones se llama el “interactoma” de la célula.

Los resultados de los estudios de interacción proteína-proteína a gran escala se pueden presentar en forma de una red, como la que se muestra en la **FIGURA 2-48**. Esta figura muestra los posibles compañeros de unión de varias proteínas de levadura que contienen un dominio SH3 (véase figura 2-42*a*) e ilustra las complejida-

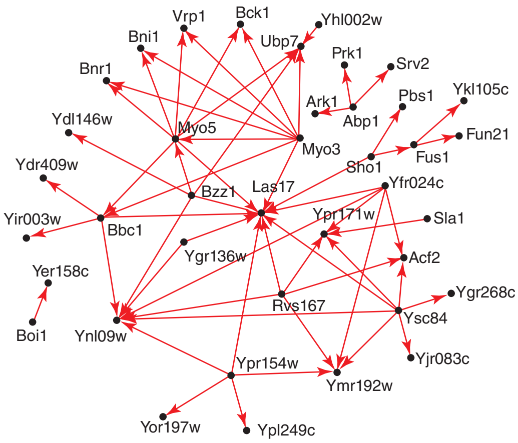



**FIGURA 2-48 Una red de interacciones proteína-proteína.** Cada línea roja representa una interacción entre dos proteínas de levadura, que están indicadas por los puntos negros con nombre. En cada caso, la flecha apunta desde una proteína de dominio SH3 a una proteína diana con la que se puede unir. Las 59 interacciones representadas aquí se detectaron utilizando dos tipos diferentes de técnicas que miden las interacciones proteína-proteína. (Véase *Nature* 417:399-403, para una discusión sobre la validez de los estudios de interacción proteína-proteína).

FUENTE: Tomada de AHY Tong, *et al*. *Science* 2002;295:323. Copyright © 2002. Reimpreso con autorización de AAAS.

des de tales interacciones en el nivel de un organismo completo. Aquellas proteínas que tienen múltiples compañeros de unión, como Las17 (situado cerca del centro de la figura 2-48), se denominan *centros* de la red de interacción de proteínas. Las proteínas concentradas son más propensas que las proteínas no concentradas a ser proteínas esenciales, es decir, proteínas de las que el organismo no puede sobrevivir. Algunas proteínas concentradoras tienen varias interfaces de enlace diferentes y son capaces de unirse a varios socios de enlace diferentes al mismo tiempo. Por el contrario, otros centros tienen una única interfaz de enlace, que es capaz de vincular a varios socios diferentes, pero solo uno a la vez. Ejemplos de cada uno de estos tipos de proteínas concentradas se ilustran en la **FIGURA 2-49**. La proteína concentrada representada en la figura 2-49*a*) desempeña un papel central en el proceso de expresión génica, mientras que la que se muestra en la figura 2-49*b*) muestra un papel igualmente importante en el proceso de división celular. En general, se estima que, en promedio, cada proteína codificada en el genoma de un organismo eucariota interactúa con aproximadamente cinco socios proteicos diferentes. Según esta estimación, las proteínas humanas se involucrarían en aproximadamente 100 000 interacciones diferentes.

Es importante recordar, al ver estos diagramas de red, que cualquier experimento automatizado a gran escala contendrá algunos errores. Para los datos interactómicos, algunas interacciones verdaderas se perderán, por ejemplo, porque la interacción es demasiado débil para sobrevivir al proceso de purificación, o porque la etiqueta TAP interrumpe un dominio que interactúa. Del mismo modo, algunas de las interacciones informadas en el análisis puede que en realidad no representen interacciones verdaderas en la celda. Por ejemplo, si una proteína está presente como contaminante al purificar un complejo de proteína particular, se informaría incorrectamente que interactúa con la proteína marcada con TAP. Por tanto, es mejor ver conjuntos de datos interactómicos que muestren posibles interacciones que puedan servir como guía para futuros experimentos que utilicen medios más directos.

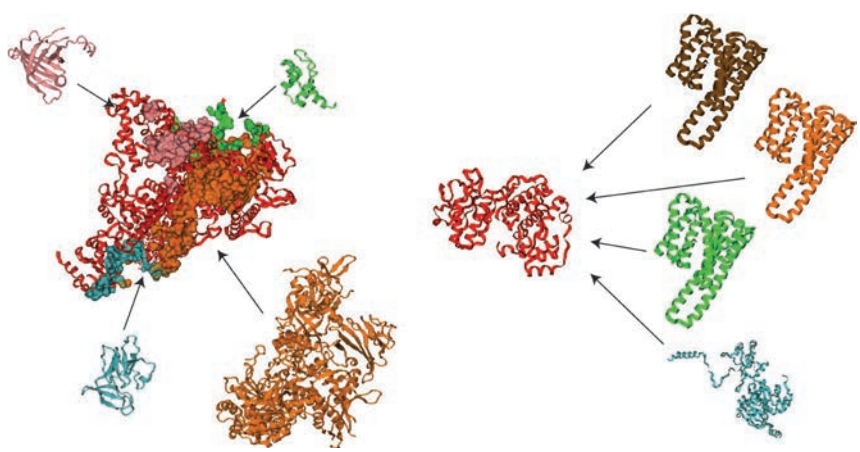
Además de obtener una larga lista de interacciones *potenciales*, ¿qué aprendemos sobre las actividades celulares de estos tipos de estudios a gran escala? Los proyectos de secuenciación del genoma han proporcionado a los científicos las secuencias de aminoácidos de un gran número de proteínas cuya existencia misma era desconocida anteriormente. ¿Qué hacen estas proteínas? Un enfoque para determinar la función de una proteína es identificar las proteínas con las que se asocia. Si, por ejemplo, se ha demostrado que una proteína conocida participa en la replicación del DNA y se encuentra que una proteína desconocida interactúa con la proteína conocida, entonces es probable que la proteína desconocida también sea parte de la replicación del DNA de la célula maquinaria. Por tanto, independientemente de sus limitaciones, estos estudios de interacción de proteínas a gran escala proporcionan el punto de partida para inferir la función de genes desconocidos en función de sus posibles parejas de interacción.

**REPASO**

1. ¿Cuál de los dos métodos discutidos en esta sección, proteómica o interactómica, nos brinda información sobre la estructura primaria de las proteínas? ¿Cuál da información sobre la estructura cuaternaria de los complejos proteicos?

## 2.16 Ingeniería de las proteínas

Los avances en biología molecular han creado la oportunidad de diseñar y producir en masa proteínas novedosas que son diferen-



*a*) *b*)

**FIGURA 2-49 Interacciones proteína-proteína de proteínas concentradas.** *a*) La enzima ARN polimerasa II, que sintetiza RNA mensajeros en la célula, se une a una multitud de otras proteínas simultáneamente utilizando múltiples interfaces. *b*) La enzima Cdc28, que fosforila otras proteínas ya que regula el ciclo de división celular de la levadura en gemación. Cdc28 une varias proteínas diferentes (Cln1-Cln3) en la misma interfaz, lo que permite que solo uno de estos socios se vincule a la vez.

FUENTE: De Damien Devos y Robert B. Russell, *Curr Opin Struct Biol* 2007;17:373, con autorización de Elsevier.

tes de las fabricadas por organismos vivos. Es posible con las técnicas actuales de sintetización de DNA crear un gen artificial que pueda usarse en la producción de una proteína que tenga cualquier secuencia deseada de aminoácidos. Los polipéptidos también pueden sintetizarse a partir de "cero" usando técnicas químicas. Esta última estrategia permite a los investigadores incorporar bloques de construcción que no sean los 20 aminoácidos que normalmente se encuentran en la naturaleza.

El problema con este tipo de esfuerzos de ingeniería es saber cuál de la variedad virtualmente infinita de proteínas posibles que uno podría fabricar lograría tener alguna función útil. Considere, por ejemplo, una compañía farmacéutica que quería fabricar una proteína terapéutica que se uniría a la superficie del sida o virus de la gripe. Supongamos que los programas de simulación por computadora podrían predecir la forma que una proteína de este tipo debería tener para unirse a la superficie viral. ¿Qué secuencia de aminoácidos encadenados produciría tal proteína? La respuesta requiere una visión detallada de las reglas que rigen la relación compleja entre las proteínas primarias y su estructura terciaria. La **FIGURA 2-50** ilustra que los bioquímicos proteínicos ahora tienen el conocimiento que les permite construir una proteína capaz de unirse a la superficie de otra proteína, en este caso la proteína hemaglutinina (HA) que estaba presente en el virus de la influenza 1918 reconstruido (p. 24). La proteína HA es utilizada por el virus para obtener la entrada a una célula humana, por lo que la inhibición de HA podría, en teoría, prevenir la infección viral. La figura 2-50*a*) muestra la proteína HA en la proximidad de una proteína de ingeniería pequeña (en verde). Esta proteína modificada por ingeniería genética es capaz de unirse a un parche hidrofóbico en la superficie de la proteína HA con alta afinidad. La figura 2-50*b*) muestra una vista más cercana de la interfaz entre la parte específica de la proteína HA (gris) y la superficie de unión de la proteína diseñada (púrpura). Se puede ver que las cadenas laterales de la proteína diseñada interactúan de manera muy específica con los sitios en la hélice α de HA. Se descubrió que este péptido inhibe la función de la proteína HA, señalando potencialmente el camino hacia futuros esfuerzos para desarrollar péptidos que se unen a HA como medicamentos antivirales.

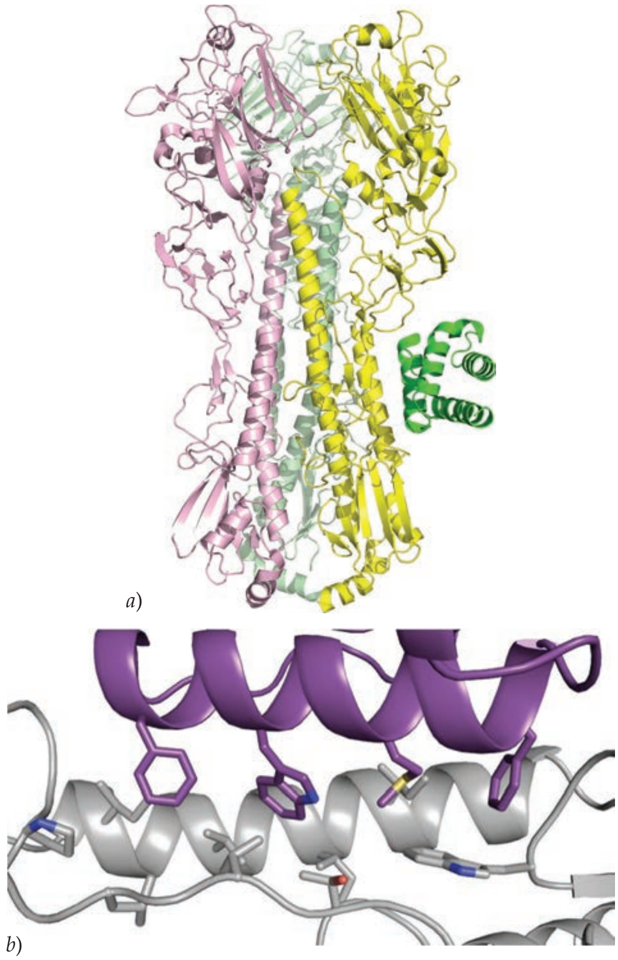



**FIGURA 2-50 El diseño computacional de una proteína que es capaz de unirse específicamente a la superficie de otra proteína.** *a*) La proteína diseñada computacionalmente se muestra en verde y su proteína diana (la proteína HA del virus de la influenza H1N1 1918) se muestra a la izquierda en múltiples colores. La estructura pronosticada de la proteína diseñada se ajusta estrechamente a la de la proteína real que se generó a partir de la secuencia predicha. *b*) La interfaz real de la hélice hidrofóbica dirigida de la proteína HA (gris) y la proteína diseñada (púrpura). Se observa que las cadenas laterales de la proteína diseñada interactúan con los sitios en la hélice HA.

FUENTE: *a*) Tomada de Sarel J. Fleishman, *et al. Science* 2011;332: 820, imagen cortesía de David Baker; *b*) Tomada de Bryan S. Der y Brian Kuhlman, *Science* 2011;332:801, ambas © 2011, reimpresas con autorización de AAA.

## Producción de nuevas proteínas

Se podría pensar que diseñar una proteína desde "cero" que sea capaz de catalizar una determinada reacción química —es decir, diseñar una enzima— estaría más allá de la capacidad de la biotecnología actual. Dada la magnitud de la tarea, fue una sorpresa cuando los investigadores informaron en 2008 que habían diseñado y producido con éxito proteínas artificiales que fueron capaces de catalizar dos reacciones orgánicas diferentes, ninguna de las cuales fue catalizada por ninguna enzima natural conocida. Una de las reacciones involucraba romper un enlace carbono-carbono, y la otra la transferencia de un protón de un átomo de carbono. Estos arquitectos de proteínas comenzaron eligiendo un mecanismo catalítico que podría acelerar cada reacción elegida y luego utilizaron cálculos basados en computadora para construir un espacio ideal en el que las cadenas laterales de aminoácidos se ubicaron (formando un *sitio activo*) para realizar la tarea. Luego buscaron entre las estructuras de proteínas conocidas para encontrar las que podrían servir como un marco o andamio que podría contener el sitio activo que habían diseñado. Para transformar los modelos de computadora en una proteína real, usaron técnicas computacionales para generar secuencias de DNA que tenían el potencial de codificar dicha proteína. Las moléculas de DNA propuestas se sintetizaron y se introdujeron en células bacterianas donde se fabricaron las proteínas. Las actividades catalíticas de las proteínas se probaron a continuación. Aquellas proteínas que mostraron la mayor promesa fueron luego sometidas a un proceso de evolución de probeta; las proteínas se mutaron para crear una nueva generación de proteínas alteradas, que a su vez podrían ser examinadas para una actividad mejorada. Finalmente, el equipo obtuvo proteínas que podrían acelerar las tasas de reacción tanto como un millón de veces la reacción no catalizada. Si bien esta no es una tasa de mejora que llene una enzima natural con orgullo, es un logro notable para un equipo de bioquímicos. Sugiere, de hecho, que los científicos finalmente podrán construir proteínas desde cero que serán capaces de catalizar prácticamente cualquier reacción química.

Un enfoque alternativo a la producción de nuevas proteínas ha sido modificar aquellas que ya están producidas por las células. Los avances recientes en la tecnología del ADN han permitido a los investigadores aislar un gen individual de los cromosomas humanos, alterar su contenido de información de una manera determinada con precisión y sintetizar la proteína modificada con su secuencia de aminoácidos alterada. Esta técnica, que se llama **mutagénesis dirigida al sitio** (sección 18.25), tiene muchos usos diferentes, tanto en investigación básica como en biología aplicada. Si, por ejemplo, un investigador desea conocer el papel de un

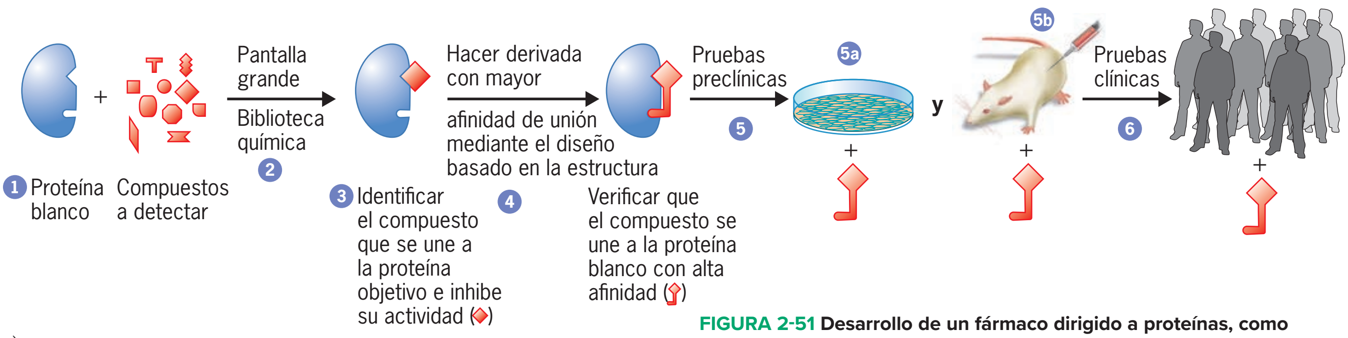
residuo particular en el plegamiento o la función de un polipéptido, el gen puede mutarse de una manera que sustituya un aminoácido con carga diferente, con carácter hidrofóbico o con las propiedades de los enlaces de hidrógeno. El efecto de la sustitución en la estructura y función de la proteína modificada puede determinarse a continuación. Como veremos a lo largo de este libro de texto, la mutagénesis dirigida al sitio ha demostrado ser invaluable en el análisis de las funciones específicas de partes diminutas de prácticamente todas las proteínas de interés para los biólogos.

La mutagénesis dirigida al sitio también se usa para modificar la estructura de proteínas clínicamente útiles para producir diversos efectos fisiológicos. Por ejemplo, el medicamento Somavert, que fue aprobado por la FDA en 2003, es una versión modificada de la hormona del crecimiento humano (GH) que contiene varias alteraciones. La GH normalmente actúa uniéndose a un receptor en la superficie de las células diana, lo que desencadena una respuesta fisiológica. Somavert compite con la GH en la unión al receptor de GH, pero la interacción entre el fármaco y el receptor no desencadena la respuesta celular. Somavert se prescribe para el tratamiento de la acromegalia, un trastorno que resulta del exceso de producción de la hormona del crecimiento.

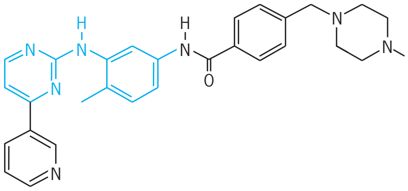
## Diseño de fármacos basada en la estructura

La producción de nuevas proteínas es una aplicación clínica de los avances recientes en biología molecular; otro es el desarrollo de nuevos fármacos que actúan uniéndose a las proteínas conocidas, inhibiendo así su actividad. Las compañías farmacéuticas tienen acceso a "archivos" químicos que contienen millones de compuestos orgánicos diferentes que han sido aislados de plantas o microorganismos o químicamente sintetizados. Una forma de buscar fármacos potenciales es exponer la proteína que se dirige a las combinaciones de estos compuestos y determinar qué compuestos, si es que los hay, se unen a la proteína con una afinidad razonable. Un enfoque alternativo, llamado *diseño de fármacos basado en estructuras*, se basa en el conocimiento de la estructura del objetivo de proteínas. Si se ha determinado la estructura terciaria de una proteína, los investigadores pueden utilizar las computadoras para diseñar moléculas de drogas "virtuales" cuyo tamaño y forma les permita encajar en las aparentes grietas y grietas de la proteína, dejándola inactiva.

Podemos ilustrar ambos enfoques considerando el desarrollo del medicamento Gleevec (nombre genérico Imatinib), como se muestra en la **FIGURA 2-51*a***). La introducción de Gleevec en la clínica ha revolucionado el tratamiento de varios cánceres relativamente raros, especialmente el de la leucemia mielógena crónica (CML). Como se detalla en los capítulos 15 y 16, un grupo de enzimas llamadas tirosina quinasas a menudo están involucradas en la transformación de las células normales en células cancerosas. Las tirosina quinasas catalizan una reacción en la que se agrega un grupo fosfato a residuos de tirosina específicos dentro de una proteína diana, un evento que puede activar o inhibir la proteína diana. El desarrollo de CML se basa casi en solitario en la presencia de una tirosina quinasa hiperactiva llamada ABL.




*a*)



*b*)



*c*)



*d*)

**FIGURA 2-51 Desarrollo de un fármaco dirigido a proteínas, como Gleevec.** *a*) Pasos típicos en el desarrollo de medicamentos. En la etapa 1, se ha identificado una proteína (p. ej., ABL) que desempeña un papel causal en la enfermedad. Esta proteína es un objetivo probable para un medicamento que inhibe su actividad enzimática. En el paso 2, la proteína se incuba con miles de compuestos en una búsqueda de aquellos que se unen con una afinidad razonable e inhiben su actividad. En la etapa 3, se ha identificado uno de tales compuestos (p. ej., 2-fenilaminopirimidina en el caso de ABL). En el paso 4, el conocimiento de la estructura de la proteína objetivo es usado para hacer derivados del compuesto (p. ej., Gleevec) que tienen una mayor afinidad de unión y, por tanto, se pueden usar a concentraciones más bajas. En la etapa 5, el compuesto en cuestión se prueba en experimentos preclínicos para determinar su toxicidad y eficacia (nivel de eficacia) *in vivo*. Los experimentos preclínicos se llevan a cabo típicamente en células humanas cultivadas (etapa 5a) (p. ej., las de pacientes con CML) y animales de laboratorio (etapa 5b) (p. ej., ratones que transportan trasplantes de células de CML humanas). Si el medicamento parece seguro y efectivo en animales, el medicamento se analiza en ensayos clínicos (paso 6) como se describe en la página 65. *b*) La estructura de Gleevec. La porción azul de la molécula indica la estructura del compuesto 2-fenilaminopirimidina que se identificó inicialmente como un inhibidor de la quinasa ABL. *c*, *d*) La estructura del dominio catalítico de ABL en el complejo *c*) con Gleevec (mostrado en amarillo) y *d*) con un inhibidor de segunda generación llamado Dasatinib. Gleevec se une a la conformación inactiva de la proteína, mientras que Dasatinib se une a la conformación activa. Ambos eventos vinculantes bloquean la actividad que se requiere para el fenotipo canceroso de la célula. Dasatinib es eficaz contra la mayoría de las células cancerosas que se han vuelto resistentes a la acción de Gleevec.

FUENTE: *c*) y *d*): de Ellen Weisberg y otros, cortesía de James D. Griffin, *Nature Revs Cancer* 2007;7:353, © 2007, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited.

Durante la década de 1980, los investigadores identificaron un compuesto llamado 2-fenilaminopirimidina que era capaz de inhibir las tirosina quinasas. Este compuesto se descubrió al seleccionar aleatoriamente una gran biblioteca química para compuestos que exhibían esta actividad particular (figura 2-51*a*). Como suele ser el caso en estos tipos de experimentos de búsqueda a ciegas, la 2-fenilaminopirimidina no habría hecho un medicamento muy eficaz. Por una razón, era solo un inhibidor débil de la enzima, lo que significaba que habría tenido que usarse en grandes cantidades. La 2-fenilaminopirimidina se describe como un compuesto líder, un punto de partida a partir del cual se pueden desarrollar medicamentos utilizables. A partir de esta molécula líder, los compuestos de mayor potencia y especificidad se sintetizaron utilizando un diseño de fármacos basado en la estructura. Uno de los compuestos para emerger de este proceso fue Gleevec (figura 2-51*b*), que se encontró que se unía estrechamente a la forma inactiva de la tirosina quinasa ABL y evitaba que la enzima se activara, lo cual es un paso necesario para que la célula cancerase. La naturaleza complementaria de la interacción entre el fármaco y su objetivo enzimático se muestra en la figura 2-51*c*). Estudios preclínicos demostraron que Gleevec inhibió fuertemente el crecimiento en el laboratorio de células de pacientes con CML y que el compuesto no mostró efectos nocivos en las pruebas en animales. En el primer ensayo clínico de Gleevec, prácticamente todos los pacientes con CML entraron en remisión después de tomar la dosis una vez al día del compuesto. Gleevec se ha convertido en el principal medicamento recetado para el tratamiento de CML, pero este no es el final de la historia. Muchos pacientes que toman Gleevec eventualmente experimentan una recurrencia de su cáncer cuando la quinasa ABL muta para volverse resistente al medicamento. En tales casos, el cáncer puede continuar siendo suprimido por el tratamiento con medicamentos diseñados más recientemente que son capaces de inhibir las formas resistentes a Gleevec de la quinasa ABL. Uno de estos inhibidores de la quinasa ABL más nuevos (segunda generación) se muestra unido a la proteína en la figura 2-51*d*).

## REPASO

1. ¿Cuáles son algunas de las formas en que el conocimiento de la estructura de las proteínas puede ayudar a desarrollar nuevas drogas?

## 2.17 Adaptación y evolución de proteínas

Las adaptaciones son rasgos que mejoran la probabilidad de que un organismo sobreviva en un entorno particular. Las proteínas son adaptaciones bioquímicas que están sujetas a la selección natural y al cambio evolutivo de la misma manera que otros tipos de características, como los ojos o los esqueletos. Esto se revela mejor al comparar las proteínas relacionadas evolutivamente (*homólogas*) en organismos que viven en condiciones muy diferentes. Por ejemplo, las proteínas de las arqueobacterias halófilas (que gustan de la sal) poseen sustituciones de aminoácidos que les permiten mantener su solubilidad y función a concentraciones de sal citosólicas muy altas (hasta 4 M de KCl). A diferencia de su contraparte en otros organismos, la superficie de la versión halófila de la proteína malato deshidrogenasa, por ejemplo, está recubierta con residuos de ácido aspártico y glutámico cuyos grupos carboxilo pueden competir con la sal por moléculas de agua (**FIGURA 2-52**).

Las proteínas homólogas aisladas de diferentes organismos pueden exhibir formas prácticamente idénticas y patrones de plegamiento, pero muestran secuencias de aminoácidos sorprendentemente divergentes. Cuanto mayor es la distancia evolutiva entre dos organismos, mayor es la diferencia en las secuencias de aminoácidos de sus proteínas. En algunos casos, solo unos pocos aminoácidos clave ubicados en una porción crítica de la proteína estarán presentes en todos los organismos a partir de los cuales se ha estudiado esa proteína. En una comparación de 226 secuencias de globina, se encontró que solo dos residuos estaban absolutamente conservados en todos estos polipéptidos; uno es un residuo de histidina que desempeña un papel clave en la unión y liberación de $O_2$. Estas observaciones indican que las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas cambian mucho más lentamente durante la evolución que sus estructuras primarias. Esto no significa que la conformación de una proteína no pueda verse afectada de manera importante por simples cambios en la estructura primaria. Un ejemplo de tal cambio se muestra en la **FIGURA 2-53**. En este caso, se introdujo experimentalmente una sustitución de aminoácidos en una proteína que alteró completamente la conformación de un dominio pequeño dentro de una molécula de proteína grande. El polipéptido de la izquierda, que tiene una leucina en la posición 45, tiene una conformación que consiste en un paquete de tres hélices α, mientras que el polipéptido de la derecha, que tiene una tirosina en esta posición tiene una conformación que contiene una única hélice α y una lámina β de cuatro cadenas. Si una mutación que tiene un efecto de esta magnitud sucediera en la naturaleza, podría resultar en la formación de una proteína con nuevas propiedades funcionales y, por tanto, podría ser responsable de generar la forma ancestral de una familia de proteínas completamente nueva.

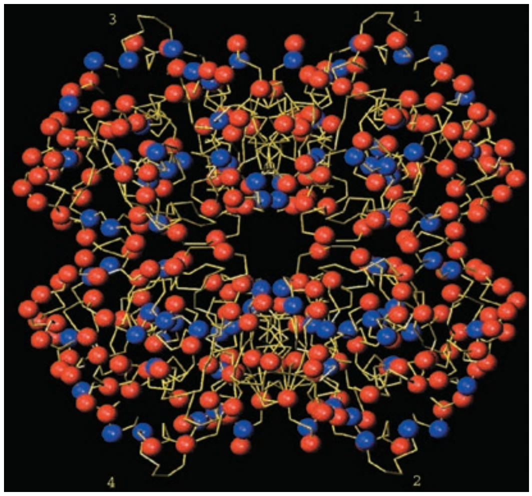



**FIGURA 2-52 Distribución de residuos de aminoácidos polares cargados en la enzima malato deshidrogenasa de una arqueobacteria halófila.** Las bolas rojas representan residuos ácidos, y las bolas azules representan residuos básicos. La superficie de la enzima se ve cubierta de residuos ácidos, lo que le da a la proteína una carga neta de –156, y promueve su solubilidad en ambientes extremadamente salados. A modo de comparación, una proteína homóloga del tiburón cazón, un tiburón que habita en el océano, tiene una carga neta de +16.

FUENTE: De O. Dym, M. Mevarech, y J. L. Sussman, *Science* 1995;267: 1345, reimpreso con autorización de AAAS.

Hemos visto cómo la evolución ha producido diferentes versiones de proteínas en distintos organismos, pero también ha producido diferentes versiones de proteínas en organismos individuales. Tome una proteína particular con una función dada, como globina o colágeno. Varias versiones diferentes de cada una de estas proteínas están codificadas por el genoma humano. En la mayoría de los casos, las diferentes versiones de una proteína, que se conocen como **isoformas**, están adaptadas para funcionar en diferentes tejidos o en distintos etapas de desarrollo. Por ejemplo, los humanos poseen seis genes diferentes que codifican isoformas de la proteína del citoesqueleto actina. Dos de estas isoformas se encuentran en el músculo liso, una en el músculo esquelético, una en el músculo cardiaco y dos en prácticamente todos los demás tipos de células.

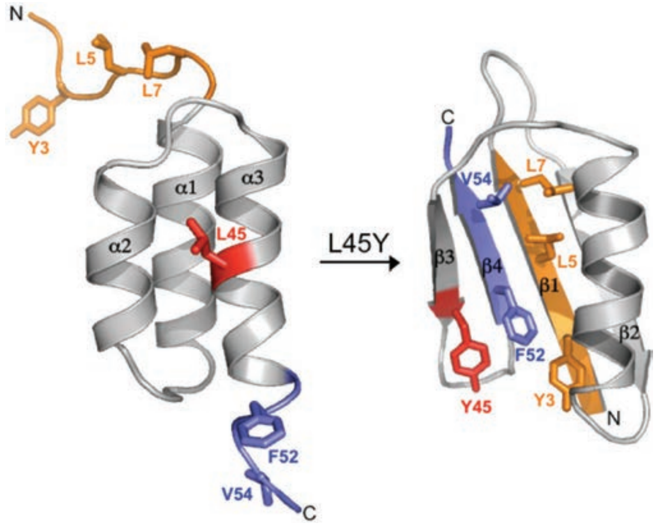



**FIGURA 2-53 El efecto dramático en la conformación que puede resultar de una única sustitución de aminoácidos.** En este caso, el cambio entre una leucina y una tirosina en una posición crítica dentro de esta cadena polipeptídica de 56 aminoácidos da como resultado una transformación de todo el pliegue de la cadena principal de este polipéptido. Esta única sustitución hace que el 85% de los residuos de aminoácidos cambien su estructura secundaria. La disposición espacial de las dos cadenas laterales alternativas, que produce este cambio conformacional, se muestra en rojo en las estructuras modelo. Los aminoácidos N-terminales se muestran en naranja y los aminoácidos C-terminales en azul.

FUENTE: Tomada de Patrick A. Alexander y otros, cortesía de Philip N. Bryan. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 2009;106:21153, Fig. 6. © 2009 National Academy of Sciences.

Ahora que se ha informado de un gran número de secuencias de aminoácidos y estructuras terciarias de proteínas, está claro que la mayoría de las proteínas son miembros de **familias** mucho más grandes (o *superfamilias*) de moléculas relacionadas. Se cree que los genes que codifican los diversos miembros de una familia de proteínas surgieron de un único gen ancestral que experimentó una serie de duplicaciones durante el curso de la evolución (véase figura 10-23). Durante largos periodos, las secuencias de nucleótidos de las diversas copias divergen unas de otras para generar proteínas con estructuras relacionadas. Muchas familias de proteínas contienen una notable variedad de proteínas que han desarrollado diversas funciones. La expansión de las familias de proteínas es responsable de gran parte de la diversidad proteínica codificada en los genomas de las plantas y animales complejos de hoy en día.

**REPASO**

1. ¿Puede un solo cambio de aminoácido alterar la estructura de una proteína?

## 2.18 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas construidas a partir de cadenas largas (cadenas) de monómeros llamados **nucleótidos**. Los ácidos nucleicos funcionan principalmente en el almacenamiento y la transmisión de información genética, pero también pueden tener funciones estructurales o catalíticas. Hay dos tipos de ácidos nucleicos que se encuentran en los organismos vivos, el **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**) y el **ácido ribonucleico** (**RNA**). El DNA sirve como el material genético de todos los organismos celulares, aunque el RNA desempeña esa función para muchos virus. En las células, la información almacenada en el DNA se usa para controlar las actividades celulares a través de la formación de mensajes de RNA. En la presente discusión, examinaremos la estructura básica de los ácidos nucleicos usando ARN monocatenario como la molécula representativa. Examinaremos la estructura del DNA en el capítulo 10, donde puede vincularse con su papel central en la base química de la vida.

Cada nucleótido en una cadena de RNA consta de tres partes (**FIGURA 2-54*a***): 1) un azúcar de cinco carbonos, ribosa; 2) una base nitrogenada (llamada así porque los átomos de nitrógeno forman parte de los anillos de la molécula), y 3) un grupo fosfato. El azúcar y la base nitrogenada juntos forman un *nucleósido*, de modo

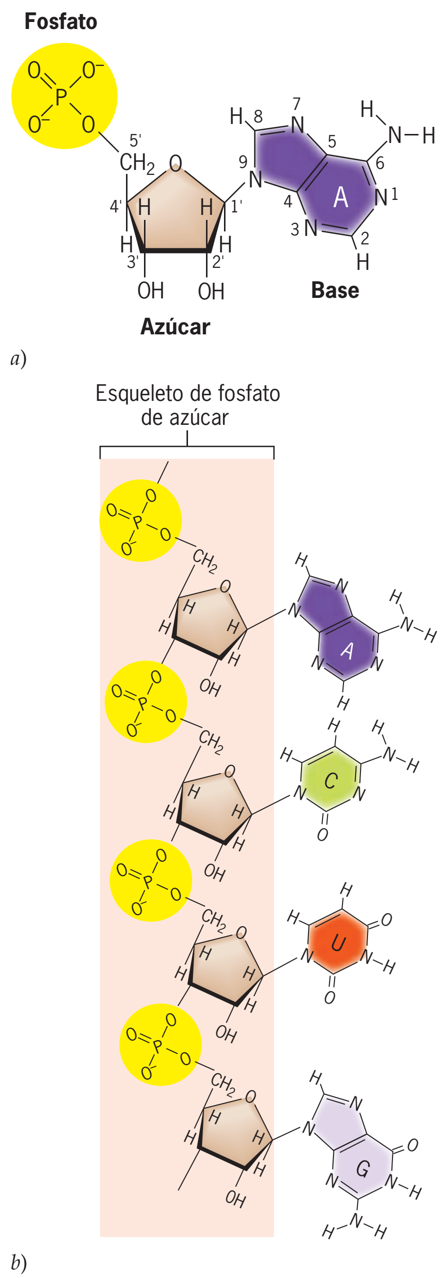



**FIGURA 2-54 Nucleótidos y cadenas de nucleótidos de RNA.** *a*) Los nucleótidos son los monómeros a partir de los cuales se construyen las cadenas de ácido nucleico. Un nucleótido consta de tres partes: un azúcar, una base nitrogenada y un fosfato. Los nucleótidos del ARN contienen el azúcar ribosa, que tiene un grupo hidroxilo unido al segundo átomo de carbono. Por el contrario, los nucleótidos del DNA contienen el azúcar desoxirribosa, que tiene un átomo de hidrógeno en lugar de un grupo hidroxilo unido al segundo átomo de carbono. Cada nucleótido está polarizado, tiene un extremo 5′ (que corresponde al lado 5′ del azúcar) y un extremo 3′. *b*) se unen nucleótidos para formar una hebra por enlaces covalentes que unen el grupo 3′ hidroxilo de un azúcar con el grupo 5′ fosfato del azúcar contiguo.

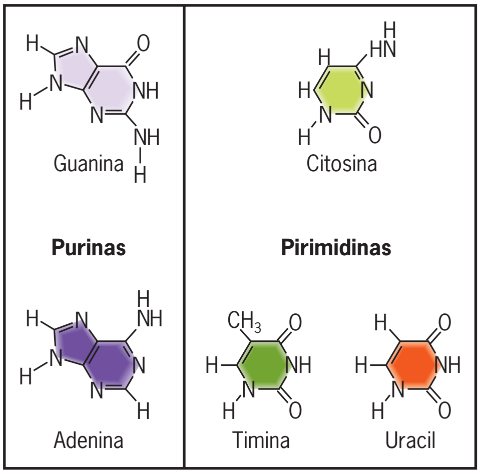


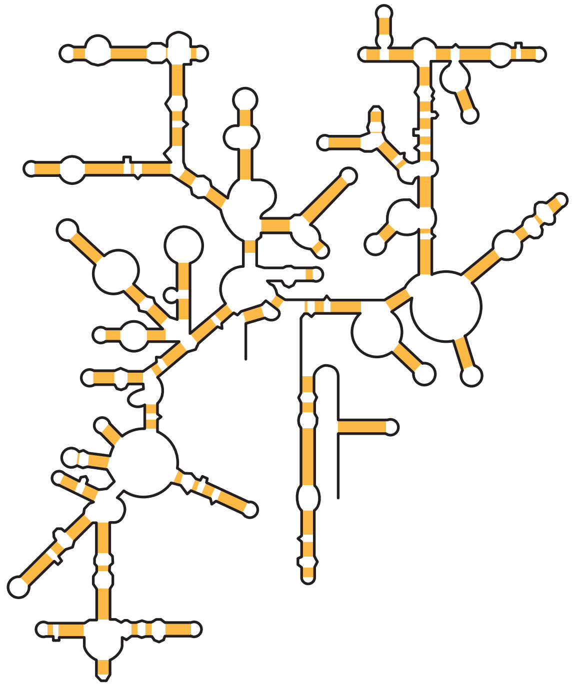

**FIGURA 2-55 Bases nitrogenadas en ácidos nucleicos.** De las cuatro bases estándar que se encuentran en el RNA, la adenina y la guanina son purinas, y el uracilo y la citosina son pirimidinas. En el DNA, las pirimidinas son citosina y timina, que difiere del uracilo por un grupo metilo unido al anillo.

que los nucleótidos de una cadena de RNA también se conocen como ribonucleósidos monofosfatos. El fosfato está ligado al carbono 5′ del azúcar, y la base nitrogenada está unida al carbono 1′ del azúcar. Durante el ensamblaje de una cadena de ácido nucleico, el grupo hidroxilo unido al carbono 3′ del azúcar de un nucleótido se une mediante un enlace éster al grupo fosfato unido al carbono 5′ del siguiente nucleótido en la cadena. Así, los nucleótidos de una cadena de RNA (o DNA) están conectados por enlaces azúcar-fosfato (figura 2-54*b*), que se describen como *enlaces fosfodiéster* 3′-5′ porque el átomo de fosfato está esterificado en dos átomos de oxígeno, uno de cada uno los dos azúcares contiguos.

Una cadena de RNA (o DNA) contiene cuatro tipos diferentes de nucleótidos que se distinguen por su base nitrogenada. Existen dos tipos de bases en los ácidos nucleicos: pirimidinas y purinas (**FIGURA 2-55**). Las **pirimidinas** son moléculas más pequeñas, que consisten en un solo anillo; las **purinas** son más grandes y constan de dos anillos. Los RNA contienen dos purinas diferentes, **adenina** y **guanina**, y dos pirimidinas diferentes, **citosina** y **uracilo**. En el DNA, el uracilo se reemplaza por **timina**, una pirimidina con un grupo metilo adicional unido al anillo (figura 2-55).

Aunque los RNA constan de una única cadena continua, a menudo se repliegan sobre sí mismos para producir moléculas que tienen amplios segmentos bicatenarios y estructuras tridimensionales complejas. Esto se ilustra mediante los dos RNA que se muestran en la **FIGURA 2-56**. El RNA cuya estructura secundaria se muestra en la figura 2-56*a*) es un componente de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (véase **FIGURA 2-57**). Los RNA ribosomales no son moléculas que llevan información genética; más bien, ellos sirven como andamios estructurales en los que se pueden unir las proteínas del ribosoma y como elementos que reconocen y unen diversos componentes solubles requeridos para la síntesis de proteínas. Uno de los RNA ribosomales de la subunidad grande actúa como el catalizador de la reacción mediante la cual los aminoácidos se unen covalentemente durante la síntesis de proteínas. Los RNA que tienen una función catalítica se llaman enzimas de RNA o **ribozimas**. La figura 2-56*b*) modifica la estructura terciaria de la llamada ribozima cabeza de martillo, que es capaz de dividir su propia cadena de RNA. En ambos ejemplos que se muestran en la figura 2-56, las regiones bicatenarias se mantienen juntas mediante enlaces de hidrógeno entre las bases. Este mismo principio es responsable de mantener unidas las dos cadenas de una molécula de DNA.

Los nucleótidos no solo son importantes como componentes básicos de los ácidos nucleicos, sino que también tienen funciones importantes por derecho propio. La mayor parte de la energía que se utiliza en cualquier momento en cualquier organismo vivo se deriva del nucleótido **trifosfato de adenosina** (**ATP**). La estructura del ATP y su papel clave en el metabolismo celular se discuten en el siguiente capítulo. El **trifosfato de guanosina** (**GTP**) es otro nucleótido de enorme importancia en las actividades celulares. El GTP se une a una variedad de proteínas (llamadas proteínas G) y actúa como un interruptor para activar sus actividades (para un ejemplo véase la figura 11-49).



*a*)



*b*)

**FIGURA 2-56 Los RNA pueden asumir formas complejas.** *a*) Este RNA ribosomal es un componente integral de la subunidad ribosómica pequeña de una bacteria. En este perfil bidimensional, se ve que la cadena de RNA se pliega sobre sí misma en un patrón altamente ordenado de modo que la mayoría de la molécula es bicatenaria. *b*) Esta ribozima de cabeza de martillo, como se la llama, es una pequeña molécula de RNA de un viroide (p. 25). La naturaleza helicoidal de las porciones bicatenarias de este RNA se puede apreciar en este modelo tridimensional de la molécula.

FUENTE: Tomada de William G. Scott, *et al*. *Cell* 1995;81:993, con autorización de Elsevier.

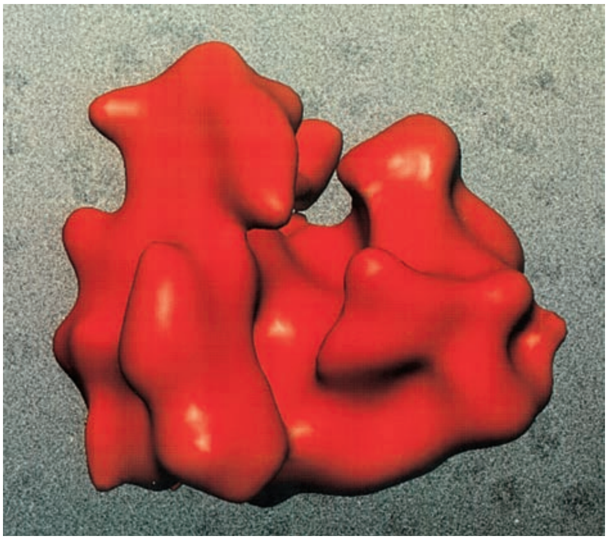


**FIGURA 2-57 Reconstrucción de un ribosoma del citoplasma de una célula germinal de trigo.** Esta reconstrucción se basa en micrografías electrónicas de alta resolución y muestra las dos subunidades de este ribosoma eucariótico, la subunidad pequeña (40S) en la izquierda y la subunidad grande (60S) en la d'erecha. La estructura interna de un ribosoma se discute en las secciones 11.16 y 11.17.

FUENTE: Tomada de Adriana Verschoor y cols. *J Cell Biol* 1996; vol. 133 (cubierta 3); con autorización de copyright de Rockefeller University Press.

**REPASO**

1. Describa la estructura de los nucleótidos y la manera en que estos monómeros se unen para formar una cadena polinucleotídica. ¿Por qué sería demasiado simplista describir el RNA como un ácido nucleico monocatenario?
2. ¿Qué macromoléculas son polímeros? ¿Cuál es la estructura básica de cada tipo de monómero? ¿Cómo varían los distintos monómeros de cada tipo de macromolécula entre ellos?

## 2.19 La formación de estructuras macromoleculares complejas

¿Hasta qué punto se pueden aplicar las lecciones aprendidas del estudio de la arquitectura de proteínas a estructuras más complejas en la célula? ¿Las estructuras de las latas, como las membranas, los ribosomas y el citoesqueleto, que consisten en diferentes tipos de subunidades, también se ensamblan por sí mismas? ¿Hasta qué punto se puede explicar la organización subcelular simplemente haciendo que las piezas encajen para formar la disposición más estable? El ensamblaje de los organelos celulares es poco conocido, pero es evidente a partir de los siguientes ejemplos que diferentes tipos de subunidades pueden autoensamblarse para formar arreglos de orden superior.

### El ensamblaje de partículas del virus del mosaico del tabaco

La evidencia más convincente de que un proceso de ensamblaje particular es autodirigido es la demostración de que el ensamblaje puede ocurrir fuera de la célula (*in vitro*) en condiciones fisiológicas cuando las únicas macromoléculas presentes son las que conforman la estructura final. En 1955, Heinz Fraenkel-Conrat y Robley Williams de la Universidad de California, Berkeley, demostraron que las partículas de TMV, que consiste en una molécula larga de RNA (aproximadamente 6 600 nucleótidos) enrollada dentro de una cápsula helicoidal hecha de 2 130 subunidades proteicas idénticas (véase figura 1-21), eran capaces de autoensamblarse. En sus experimentos, purificaron el RNA y la proteína del TMV por separado, los mezclaron juntos en condiciones adecuadas y recuperaron partículas infectadas maduras después de un corto periodo de incubación. Claramente, los dos componentes contienen toda la información necesaria para la formación de partículas.

### El conjunto de subunidades ribosómicas

Los ribosomas, como las partículas de TMV, están hechos de RNA y proteínas. A diferencia del TMV más simple, los ribosomas contienen varios tipos diferentes de RNA y una considerable colección de proteínas diferentes. Todos los ribosomas, independientemente de su fuente, se componen de dos subunidades de diferente tamaño. Aunque las subunidades ribosomales a menudo se representan en dibujos como estructuras simétricas, de hecho tienen una forma muy irregular, como se indica en la figura 2-57. La subunidad ribosomal grande (o 50S) de bacterias contiene dos moléculas de RNA y aproximadamente 32 proteínas diferentes. La subunidad ribosómica pequeña (o 30S) de bacterias contiene una molécula de RNA y 21 proteínas diferentes. La estructura y función del ribosoma se discuten en detalle en las secciones 11.16 y 11.17.

Uno de los hitos en el estudio de los ribosomas se produjo a mediados de la década de 1960, cuando Masayasu Nomura y sus colegas de la Universidad de Wisconsin lograron reconstituir subunidades bacterianas 30S completamente funcionales al mezclar las 21 proteínas purificadas de la subunidad pequeña con RNA ribosómico de subunidad pequeña purificada. Aparentemente, los componentes de la subunidad pequeña contienen toda la información necesaria para el ensamblaje de la partícula completa. El análisis de los compuestos intermedios que se forman en diferentes etapas durante la reconstitución *in vitro* indica que el ensamblaje de la subunidad se produce de una manera secuencial paso a paso que es muy similar al proceso *in vivo*. Al menos una de las proteínas de la subunidad pequeña (S16) parece funcionar únicamente en el ensamblaje de ribosomas; la deleción de esta proteína de la mezcla de reconstitución ralentizó en gran medida el proceso de ensamblaje pero no bloqueó la formación de ribosomas completamente funcionales. La reconstitución de la gran subunidad del ribosoma bacteriano se logró en la siguiente década. Debe tenerse en cuenta que, aunque se necesitan aproximadamente dos horas a 50 °C para reconstituir el ribosoma *in vitro*, la bacteria puede ensamblar la misma estructura en pocos minutos a temperaturas tan bajas como 10 °C. Puede ser que la bacteria use algo que no está disponible para el investigador que comienza con los componentes purificados. El ensamblaje del ribosoma dentro de la célula, por ejemplo, puede incluir la participación de factores accesorios que funcionan en el plegamiento de proteínas, como los chaperones descritos en las vías experimentales. De hecho, la formación de ribosomas dentro de una célula *eucariótica* requiere la asociación transitoria de muchas proteínas que no terminan en la partícula final, así como la eliminación de aproximadamente la mitad de los nucleótidos del precursor de RNA ribosómico grande (sección 11.4). Como resultado, los componentes del ribosoma eucariótico maduro ya no poseen la información para reconstituirse *in vitro*.

**REPASO**

1. ¿Qué tipo de evidencia sugiere que las subunidades ribosómicas bacterianas son capaces de autoensamblarse, pero las subunidades eucariotas no lo son?
2. ¿Qué evidencia indicaría que una proteína ribosomal particular tenía un rol en la función del ribosoma pero no en el ensamblaje?

# Preguntas analíticas



1. El pH de las bebidas de cola es de alrededor de 3, mientras que el pH del ácido de la batería es alrededor de 1. ¿Cuál tiene una mayor concentración de protones? ¿De cuánto es la diferencia? Si la concentración de protones en el vino es aproximadamente un décimo del que tiene la cola, ¿cuál es el pH del vino?, (véase **video tutorial cuantitativo**).
2. La anemia falciforme es el resultado de una sustitución de un ácido glutámico por una valina. ¿Es posible esperar un efecto similar si la mutación fuera a colocar una leucina en ese sitio? ¿O un ácido aspártico?
3. De los siguientes aminoácidos, glicina, isoleucina y lisina, ¿cuál esperaría que fuera el más soluble en una solución acuosa ácida? ¿Cuál es el menos soluble?
4. ¿Cuántos isómeros estructurales podrían formarse a partir de una molécula con las fórmulas $C_5H_{12}$ y $C_4H_8$?
5. El gliceraldehído es la única aldotetrosa de tres carbonos, y puede existir como dos estereoisómeros. ¿Cuál es la estructura de la dihidroxiacetona, la única ketotriosa? ¿Cuántos estereoisómeros se forman?
6. Se sabe que las bacterias cambian los tipos de ácidos grasos que producen a medida que cambia la temperatura de su entorno. ¿Qué tipos de cambios en los ácidos grasos esperarías a medida que baja la temperatura? ¿Por qué sería esto adaptativo?
7. En la cadena principal polipeptídica —C—C—N—C—C—N—C—C—$NH_2$, identifique los carbonos *α*.
8. ¿Cuál de los siguientes son verdaderos? El aumento del pH de una solución podría 1) suprimir la disociación de un ácido carboxílico, 2) aumentar la carga en un grupo amino, 3) aumentar la disociación de un ácido carboxílico, 4) suprimir la carga en un grupo amino.
9. ¿Cuál de las cuatro clases de aminoácidos tiene cadenas laterales con el mayor potencial de formación de enlaces de hidrógeno? ¿Cuál tiene el mayor potencial para formar enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas?
10. Si las tres enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa existieran como proteínas físicamente separadas en lugar de como un complejo, ¿qué efecto podría tener esto sobre la tasa de reacciones catalizadas por estas enzimas?
11. ¿Estaría de acuerdo en que ni la ribonucleasa ni la mioglobina tenían estructura cuaternaria? ¿Por qué o por qué no?
12. ¿Cuántos tripéptidos diferentes son posibles? ¿Cuántas terminales carboxílicas de cadenas polipeptídicas están presentes en una molécula de hemoglobina? (véase **video tutorial cuantitativo**).
13. Usted ha aislado un pentapéptido compuesto de cuatro residuos de glicina y un residuo de lisina que reside en el extremo C del péptido. Usando la información proporcionada en la leyenda de la figura 2-27, si el pK de la cadena lateral de lisina es 10 y el pK del grupo carboxilo terminal es 4, ¿cuál es la estructura del péptido a pH 7 y a pH 12?
14. Las cadenas laterales de ácido glutámico (pK 4.3) y arginina (pK 12.5) pueden formar un enlace iónico bajo ciertas condiciones. Dibuje las partes relevantes de las cadenas laterales e indique si se podría formar un enlace iónico de la siguiente manera: *a*) pH 4; *b*) pH 7; *c*) pH 12; *d*) pH 13.
15. ¿Esperaría una solución de alto contenido de sal para desnaturalizar la ribonucleasa? ¿Por qué o por qué no?
16. Usted ha leído en la Perspectiva humana que 1) las mutaciones en el gen *PRNP* pueden hacer que un polipéptido sea más propenso a plegarse en la conformación $PrP^{Sc}$, causando CJD y 2) la exposición al prion $PrP^{Sc}$ puede conducir a una infección que también causa CJD. ¿Cómo se puede explicar la ocurrencia de casos esporádicos raros de la enfermedad en personas que no tienen una propensión genética?
17. Las personas que nacen con síndrome de Down tienen una copia adicional (tercera) del cromosoma 21 en sus células. El cromosoma 21 contiene el gen que codifica la proteína APP. ¿Por qué supone que las personas con síndrome de Down típicamente desarrollan la enfermedad de Alzheimer a una edad temprana?
18. Vimos en la página 77 cómo la evolución ha llevado a la existencia de familias de proteínas compuestas de moléculas relacionadas con funciones similares. También se conocen algunos ejemplos donde las proteínas con funciones muy similares tienen estructuras primarias y terciarias que no muestran evidencia de relación evolutiva. La subtilisina y la tripsina, por ejemplo, son dos enzimas que digieren proteínas (proteasas) que no muestran ninguna evidencia de que sean homólogas a pesar del hecho de que utilizan el mismo mecanismo para atacar sus sustratos. ¿Cómo se puede explicar esta coincidencia?
19. ¿Estaría de acuerdo con la afirmación de que muchas secuencias de aminoácidos diferentes pueden plegarse en la misma estructura terciaria básica? ¿Qué datos puedes citar como evidencia de tu posición?
20. En palabras de un científico: "La primera pregunta que hace cualquier biólogo estructural al saber que se ha resuelto una nueva estructura [proteica] ya no es '¿Qué parece ser? ahora es '¿A qué se parece?'"¿Qué supones que quiso decir con esta declaración?

# 3 CAPÍTULO

# Bioenergética, enzimas y metabolismo

## NO ERES LO QUE COMES

El cuerpo humano es una máquina de complejidad casi inimaginable. Cada día nuestro cuerpo gasta alrededor de 2 000 kcal de energía, que usamos para impulsar el movimiento, el metabolismo y el pensamiento. Obtenemos esta energía de los alimentos que comemos, pero a diferencia del motor de un automóvil que puede convertir un combustible químico (gasolina) en fuerza mecánica directamente, nuestros cuerpos realizan una compleja serie de reacciones bioquímicas para convertir los nutrientes de los alimentos en la moneda universal de la energía biológica, la pequeña molécula trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*). Esta red de reacciones está organizada por un grupo de enzimas que canalizan las biomoléculas que ingerimos hacia reacciones que producen el ATP para la energía, así como también hacia las reacciones que construyen las sustancias bioquímicas que necesitamos como bloques de construcción para células y tejidos.

Personas diferentes tienen hábitos alimenticios muy distintos. Dietas bajas en carbohidratos, dietas veganas, dietas paleo —cada una con diferencias impresionantes en la composición bioquímica de los alimentos—. Sin embargo, las personas que consumen estas dietas diferentes se ven iguales, se comportan igual y contienen las mismas células y moléculas. Si comes maíz todos los días, no te conviertes en una planta de maíz. ¿Cómo se mantiene constante la composición química de nuestros cuerpos cuando nuestra ingesta de alimentos puede ser tan variable? Una vez más, la respuesta está en la red de reacciones bioquímicas, orquestadas por enzimas que pueden convertir un tipo de bioquímico en otro. No somos lo que comemos: somos lo que nuestras enzimas nos hacen.



Pintura de Giuseppe Arcimboldo: Rudolf II de Habsburgo como Vertumnus.

FUENTE: pintura de Giuseppe Arcimboldo.

LibrosMedicos

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


- 3.1 Las leyes de la termodinámica
- 3.2 Energía libre
- 3.3 Acoplamiento de reacciones endergónicas y exergónicas
- 3.4 Equilibrio *versus* metabolismo de estado estacionario
- 3.5 Las enzimas como catalizadores biológicos
- 3.6 Mecanismos de la catálisis de enzimas
- 3.7 Cinética de enzimas
- 3.8 **PERSPECTIVA HUMANA:** El creciente problema de la resistencia a los antibióticos
- 3.9 Una descripción del metabolismo
- 3.10 Glucólisis y fermentación
- 3.11 Poder reductor
- 3.12 Regulación metabólica
- 3.13 Separación de las vías anabólica y catabólica
- 3.14 **PERSPECTIVA HUMANA:** Restricción calórica y longevidad

## 3.1 Las leyes de la termodinámica

Una célula viviente bulle de actividad. Las macromoléculas de todos los tipos se ensamblan a partir de materias primas, los productos de desecho generan y excretan, las instrucciones genéticas fluyen del núcleo al citoplasma, las vesículas se mueven a lo largo de la ruta secretora, los iones se bombean a través de las membranas celulares, y así sucesivamente. Para mantener un nivel tan alto de actividad, una célula debe adquirir y gastar energía. El estudio de los diversos tipos de transformaciones de energía que ocurren en los organismos vivos se conoce como **bioenergética**.

La **energía** se define como la capacidad de hacer trabajo, es decir, la capacidad de cambiar o mover algo. La **termodinámica** es el estudio de los cambios de energía que acompañan a los eventos del universo. En las siguientes secciones, nos enfocaremos en un conjunto de conceptos que nos permiten predecir la dirección que tomarán los eventos, y si se requiere una entrada de energía para provocarlos. Sin embargo, las mediciones termodinámicas no ayudan a determinar qué tan rápido ocurrirá un proceso específico, o el mecanismo utilizado por la célula para llevar a cabo el mismo.

### La primera ley de la termodinámica

La **primera ley de la termodinámica** es la ley de la conservación de la energía. Establece que la energía no puede ser creada ni destruida. Sin embargo, la energía se puede convertir (*transformarse*) de una forma a otra. La transformación de la energía mecánica a la energía eléctrica se produce en las grandes turbinas eólicas que ahora se utilizan para generar energía a partir del viento (véase **FIGURA 3-1*a***), y la energía química se convierte en energía eléctrica mediante generadores impulsados por gas. También se puede almacenar energía; por ejemplo, la energía eléctrica se puede almacenar en forma química mediante una batería recargable (consúltese la figura 3-1*b*), y la energía mecánica puede almacenarse en el muelle de un juguete de cuerda. La energía almacenada se puede transportar de un lugar a otro; por ejemplo, la energía química almacenada en la gasolina puede transportarse a largas distancias en camiones cisterna. La energía almacenada se puede utilizar transformándola de su forma de almacenamiento a otra forma útil, como en el caso de la energía eléctrica almacenada en una batería, que puede convertirse en trabajo mecánico mediante un motor eléctrico (véase la figura 3-1*c*).

Las células también son capaces de transformar, almacenar y transportar la energía. Como se discutirá en capítulos posteriores, la energía química almacenada en ciertas moléculas biológicas como el ATP se convierte en energía mecánica cuando los músculos se contraen (obsérvese la figura 3-1*d*), en energía eléctrica cuando los iones fluyen a través de una membrana (obsérvese la figura 3-1*e*), o en energía térmica cuando temblamos de frío. La transformación de energía más importante en el mundo biológico es la conversión de la luz solar en energía química —el proceso de fotosíntesis— que proporciona el combustible que alimenta, directa o indirectamente, las actividades de casi todas las formas de vida.[1]

[1] Se conocen varias comunidades de organismos que son independientes de la fotosíntesis. Estas incluyen las comunidades que residen en los respiraderos hidrotermales en lo profundo del suelo oceánico que dependen de la energía obtenida por quimiosíntesis bacteriana.

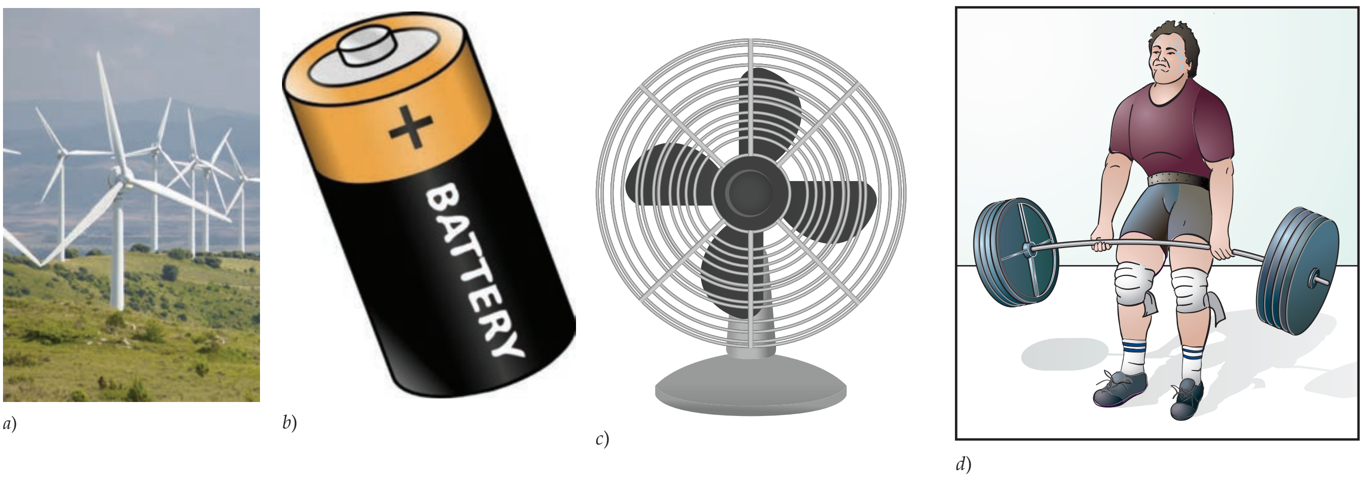
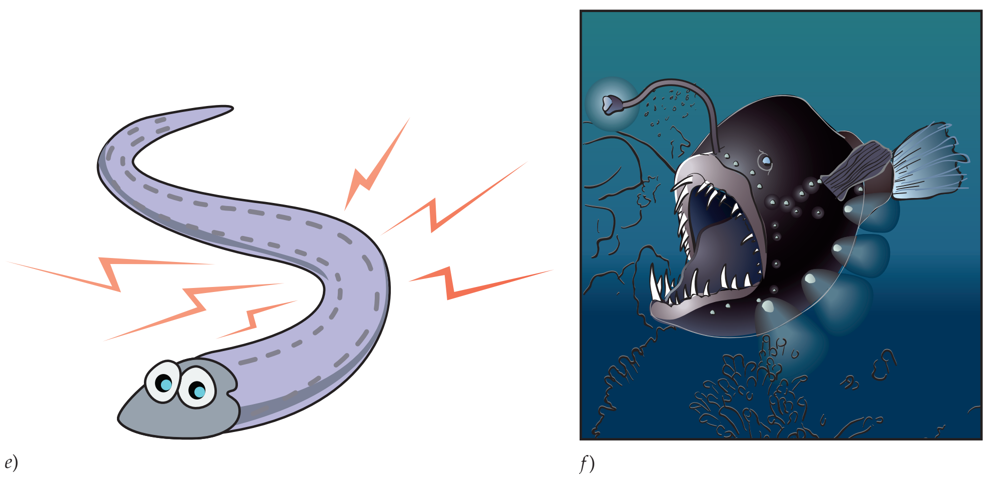



**FIGURA 3-1 Ejemplos de transformación de energía**. *a*) Conversión de energía mecánica a energía eléctrica en una turbina eólica, *b*) almacenamiento de energía eléctrica en forma química dentro de una batería, *c*) conversión de energía eléctrica a energía mecánica mediante un motor eléctrico, en este caso el movimiento de un ventilador, *d*) conversión de energía química a energía mecánica por parte de los músculos, *e*) conversión de energía química a energía eléctrica en una anguila eléctrica, que puede generar 500 voltios mediante sus órganos eléctricos, *f*) conversión de energía química en luz en organismos bioluminiscentes.
FUENTE: *a*) pedrosala/Shutterstock.



Varios animales, incluidos las luciérnagas y los peces luminosos, pueden volver a convertir la energía química en luz (véase figura 3-1*f*). No obstante, con independencia del proceso de transformación, la cantidad total de energía en el universo permanece constante.

Para analizar las transformaciones de energía que involucran los objetos, necesitamos dividir el universo en dos partes: el *sistema* en estudio y el resto del universo, al que nos referiremos como los *alrededores*. Un sistema se puede definir de varias maneras: puede ser un cierto espacio en el universo o una cierta porción de materia. Por ejemplo, el sistema puede ser una célula viva. Los cambios en la energía de un sistema que ocurren durante un evento se manifiestan de dos maneras: como un cambio en el flujo de calor desde o hacia el sistema y en la ejecución de trabajo. Aunque el sistema puede perder o ganar energía, la primera ley de la termodinámica indica que la pérdida o ganancia se debe equilibrar con una ganancia o pérdida correspondiente en el entorno, de modo que la cantidad en el universo como un todo permanezca constante. La energía del sistema se denomina *energía interna* ($E$) y su cambio durante una transformación es $\Delta E$ (delta $E$). Una forma de describir la primera ley de la termodinámica es que $\Delta E = Q - W$, donde $Q$ es la energía transmitida en forma de calor y $W$ la energía transmitida en forma de trabajo. Si un sistema empuja o tira contra una fuerza $F$ sobre una distancia $d$, entonces el trabajo realizado durante ese movimiento es $W = Fd$. Esta definición se ajusta a nuestras ideas intuitivas sobre la palabra trabajo. Imagine levantar un objeto pesado: si tiene que levantarlo dos veces más, realiza el doble de trabajo y también realiza el doble de trabajo si el peso es dos veces mayor, de modo que la fuerza de gravedad es el doble.

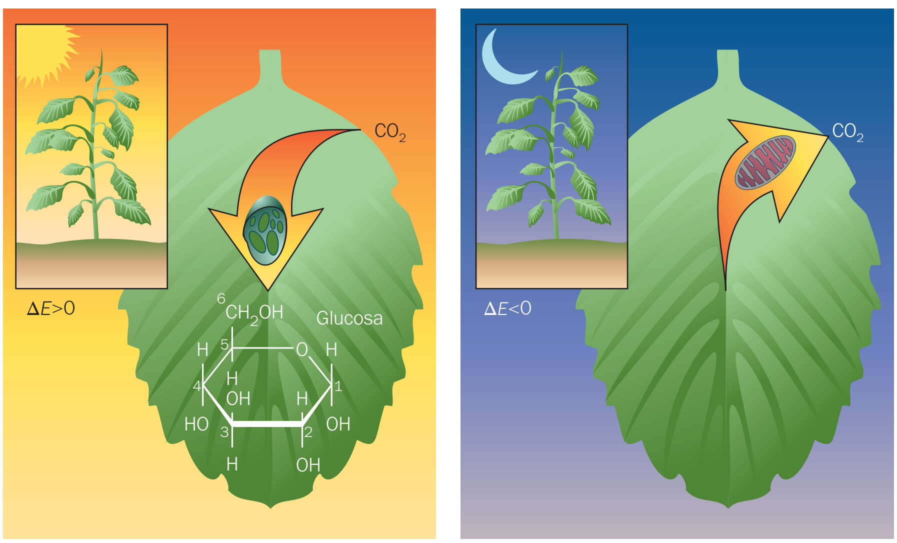
En dependencia del proceso, la energía interna del sistema al final puede ser mayor, igual o menor que su energía interna al inicio, de acuerdo a la relación con su entorno (consúltese **FIGURA 3-2**). En otras palabras, $\Delta E$ puede ser positivo, cero o negativo. Considere que un sistema es el contenido de un recipiente de reacción. Siempre que no haya cambios en la presión o el volumen del contenido, el sistema no realiza ningún trabajo en su entorno, o viceversa. En ese caso la energía interna al final de la transformación será mayor que al principio si se absorbe calor, y menor si se libera calor. Las reacciones que pierden calor se denominan **exotérmicas** y las que ganan calor son **endotérmicas**, y hay muchas reacciones de ambos tipos. Como para una reacción particular $\Delta E$ puede ser positivo o negativo, no nos da información sobre la probabilidad de que ocurra un evento determinado. Para determinar la probabilidad de una transformación particular, debemos considerar algunos conceptos adicionales.

## La segunda ley de la termodinámica

La **segunda ley de la termodinámica** expresa el concepto de que los eventos en el universo tienen dirección; tienden a proceder "colina abajo" desde un estado de mayor energía a un estado de menor energía. Por tanto, en cualquier transformación de energía hay una disponibilidad decreciente de energía para hacer trabajo adicional. Las rocas caen desde los acantilados hasta el suelo, y una vez abajo, se reduce su capacidad de trabajo adicional; es muy poco probable que se eleven hasta la cima del acantilado. De manera similar, las cargas opuestas normalmente se mueven juntas, no separadas, y el calor fluye de un cuerpo caliente a uno frío, no a la inversa. Se dice que estos eventos son **espontáneos**, un término que indica que son termodinámicamente favorables y que pueden ocurrir *sin entrada de energía externa*.

El concepto de la segunda ley de la termodinámica se formuló originalmente para los motores de combustión, y la ley llevó consigo la idea de que es termodinámicamente imposible construir una máquina de movimiento perpetuo. En otras palabras, es imposible que una máquina sea 100% eficiente, lo cual sería necesario si continuara funcionando sin la entrada de energía externa. Parte de la energía se pierde inevitablemente a medida que la máquina lleva a cabo su actividad. Una relación similar es válida para los organismos vivos. Por ejemplo, cuando una jirafa examina las hojas de un árbol, o un león se alimenta de la jirafa, gran parte de la energía química de la comida nunca está disponible para el animal que está comiendo.

La pérdida de energía disponible durante un proceso es el resultado de una tendencia a que la aleatoriedad o desorden del universo aumenta cada vez que hay una transferencia de energía. Esta ganancia en el desorden es medida por el término **entropía**, y la pérdida de energía disponible es igual a $T\Delta S$, donde $\Delta S$ es el cambio en la entropía entre los estados inicial y final. La entropía está asociada con los movimientos *aleatorios* de partículas materiales que, como son aleatorios, no se pueden utilizar para llevar a cabo un proceso de trabajo *dirigido*. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, cada evento va acompañado de un aumento en la entropía del universo. Cuando se coloca un cubo de azúcar en una taza de agua caliente, por ejemplo, hay un desplazamiento espontáneo de las moléculas de un estado ordenado en el cristal a una condición mucho más desordenada cuando las




*a*) *b*)

**FIGURA 3-2** Cambio en la energía interna de un sistema. En este ejemplo, el sistema se definirá como una hoja particular de una planta. *a*) Durante el día, la luz solar es absorbida por pigmentos de fotosíntesis en los cloroplastos de la hoja, y se usa para convertir $CO_2$ en carbohidratos, como la molécula de glucosa que se muestra en el dibujo (que posteriormente se incorpora en la sacarosa o el almidón). A medida que la célula absorbe la luz, su energía interna aumenta; la energía presente en el resto del universo tiene que disminuir. *b*) Por la noche, la relación de energía entre la célula y su entorno se invierte a medida que los carbohidratos producidos durante el día se oxidan a $CO_2$ en la mitocondria, y la energía se utiliza para ejecutar las actividades nocturnas de la célula.

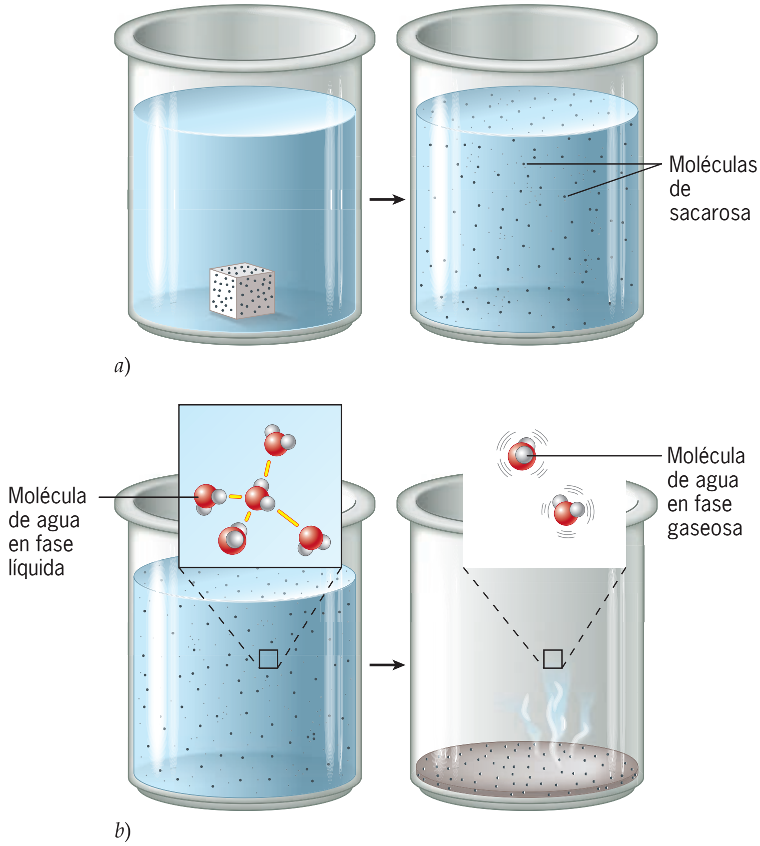



**FIGURA 3-3 Los eventos van acompañados por un aumento en la entropía del universo.** *a*) Un cubo de azúcar contiene moléculas de sacarosa en una disposición altamente ordenada en la que se restringe su libertad de movimiento. A medida que el cubo se disuelve, la libertad de movimiento de las moléculas de sacarosa aumenta enormemente, y su movimiento aleatorio hace que se distribuyan por igual en todo el espacio disponible. Una vez que esto ocurre, no habrá más tendencia a la redistribución, y la entropía del sistema estará en su punto máximo. *b*) Las moléculas de azúcar diseminadas aleatoriamente a través de una solución pueden regresar a un estado ordenado, pero solo si aumenta la entropía del entorno, como ocurre cuando las moléculas de agua más ordenadas de la fase líquida se desordenan después de la evaporación.

moléculas de azúcar se extienden por toda la solución [véase **FIGURA 3-3*a*)**]. A medida que las moléculas del cubo de azúcar se disuelven en la disolución, su libertad de movimiento aumenta, al igual que la entropía del sistema. El cambio de un estado concentrado a uno disperso es el resultado de los movimientos aleatorios de las moléculas. Las moléculas de azúcar eventualmente se distribuyen por igual a través del volumen disponible, porque el estado de distribución uniforme es el estado más probable.

Por ejemplo, la liberación del calor de oxidación de la glucosa dentro de una célula, o de la fricción generada cuando la sangre fluye a través de un vaso, es otro ejemplo de aumento de la entropía. La liberación de energía térmica por los organismos vivos aumenta la velocidad de los movimientos aleatorios de átomos y moléculas; no se puede redireccionar para realizar un trabajo adicional. Como la energía de los movimientos moleculares y atómicos aumenta con la temperatura, también lo hace la entropía. Solo en el cero absoluto (0 K), cuando cesan todos los movimientos, la entropía es cero.

Al igual que con otros eventos espontáneos, debemos distinguir entre el sistema y su entorno. La segunda ley de la termodinámica indica solo que la entropía total en el universo debe aumentar; el desorden dentro de una parte del universo (el sistema) puede disminuir a un mayor costo de su entorno. El azúcar disuelto en la figura 3-3*a*) puede disminuir en entropía; se puede recristalizar vaporizando el agua [véase figura 3-3*b*)]. La consecuencia de este proceso, sin embargo, es un aumento aún mayor en la entropía de los alrededores. El incremento en la libertad de movimiento de las moléculas de agua en la fase gaseosa es mayor que la necesaria para equilibrar la disminución de la libertad de movimiento de las moléculas de los cristales de azúcar.

La vida opera con un principio similar. Los organismos vivos son capaces de disminuir su propia entropía al aumentar la entropía de su entorno. La entropía disminuye en un organismo cuando moléculas relativamente simples, como los aminoácidos, se ordenan en moléculas más complejas, como la proteína mioglobina en una célula muscular. Sin embargo, para que esto ocurra debe aumentar la entropía del entorno, lo que se logra a medida que moléculas complejas y ordenadas, como el glucógeno almacenado en el hígado o en el tejido muscular, se conviertan en calor y compuestos más pequeños y menos ordenados (como el $CO_2$ y $H_2O$) y sean expulsados al medio ambiente. Es esta característica del metabolismo la que permite a los organismos vivos mantener un estado tan altamente ordenado e improbable —al menos por un tiempo—.

Otra medida del estado de energía de un organismo vivo está dada por el contenido de información de sus macromoléculas. La información es un concepto difícil de definir, pero fácil de reconocer. La información se puede medir en términos de la disposición ordenada de las subunidades de una estructura. Por ejemplo, las proteínas y los ácidos nucleicos, en los que la secuencia lineal específica de las subunidades está altamente ordenada, son bajos en entropía y tienen un alto contenido de información. Mantener un estado de alto contenido de información (baja entropía) requiere la entrada de energía. Considere una sola molécula de DNA ubicada en una célula de su hígado. Esa célula tiene docenas de proteínas diferentes cuyo único trabajo es patrullar el DNA, buscar daños y repararlos (se trata en la sección 13.8). El daño de los nucleótidos en una célula activa puede ser tan grande que, sin este gasto de energía, el contenido de información del DNA se deterioraría rápidamente.

## REPASO

1. Describa las diferencias entre la primera y la segunda leyes de la termodinámica y cómo, cuando se toman juntas, pueden describir la dirección de los eventos que tienen lugar en el universo.
2. ¿De qué manera el mantenimiento del estado de vida ordenado es consistente con la segunda ley de la termodinámica?
3. Describe dos ejemplos en los que la entropía de un sistema disminuye, y dos ejemplos en los que aumenta.

## 3.2 Energía libre

Juntas, la primera y la segunda leyes de la termodinámica indican que la energía del universo es constante, pero la entropía continúa aumentando hacia un máximo. Los conceptos inherentes a las dos primeras leyes fueron combinados por el químico estadounidense, J. Willard Gibbs en 1878 en la expresión $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$, donde $\Delta G$ (delta $G$) es la variación de **energía libre**; es decir, el cambio de la energía disponible para hacer trabajo durante un proceso; $\Delta H$ es la variación de entalpía o contenido total de energía del sistema (equivalente a $\Delta E$ para nuestros propósitos), $T$ es la temperatura absoluta ($K$ = °C + 273) y $\Delta S$ la variación de la entropía del sistema. La ecuación establece que el cambio de energía total es igual a la suma de los cambios en la energía útil ($\Delta G$) y la energía que no está disponible para hacer más trabajo ($T\Delta S$).

Cuando se reordena y escribe como $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, la ecuación anterior proporciona una medida de la espontaneidad de un proceso particular. Permite predecir la dirección en la que continuará un proceso y la medida en que este ocurrirá. Todas las transformaciones espontáneas de energía deben tener un $\Delta G$ negativo; es decir, el proceso debe avanzar hacia un estado de menor energía libre. La magnitud $\Delta G$ indica la cantidad máxima de energía que puede transformar para su uso en otro proceso, pero no dice nada acerca de qué tan rápido ocurrirá el proceso. Los procesos que pueden ocurrir espontáneamente, es decir, los procesos que se ven favorecidos termodinámicamente (tienen un $-\Delta G$), se describen como **exergónicos**. Por el contrario, si el $\Delta G$ para un proceso dado es positivo, entonces no puede ocurrir espontáneamente. Dichos procesos son termodinámicamente desfavorables y se describen como **endergónicos**. Como veremos, reacciones que normalmente son endergónicas se puede producir al acoplarlas a procesos de liberación de energía.

Los signos de $\Delta H$ y $\Delta S$ para una transformación dada pueden ser positivos o negativos, en dependencia de la relación entre el sistema y su entorno. (Por tanto, $\Delta H$ será positivo si el sistema gana calor y negativo si pierde calor; $\Delta S$ será positivo si el sistema se vuelve más desordenado y negativo si se vuelve más ordenado.) El contrajuego entre $\Delta H$ y $\Delta S$ se ilustra con la transformación de agua helada. La conversión del agua líquida al estado sólido se acompaña de una disminución de la entropía ($\Delta S$ es negativo, como se ilustra en la **FIGURA 3-4**) y de una disminución de la entalpía ($\Delta H$ es negativo). Para que se produzca esta transformación (es decir, que $\Delta G$ sea negativo), $\Delta H$ debe ser más negativo que $T\Delta S$, una condición que ocurre solo por debajo de 0 °C. Esta relación se puede ver en la tabla 3-1, que indica los valores para los diferentes términos si un mol de agua se convirtiera en hielo a 10 °C, 0 °C o −10 °C. En todos los casos, con independencia de la temperatura, el nivel de energía del hielo es menor que el del líquido (el $\Delta H$ es negativo). Sin embargo, a mayor temperatura el término de entropía de la ecuación ($T\Delta S$) es más negativo que el término de entalpía; por tanto, el cambio de energía libre es positivo, y el proceso no puede ocurrir espontáneamente. A 0 °C el sistema está en equilibrio; a −10 °C se favorece el proceso de solidificación, es decir, el $\Delta G$ es negativo.



**FIGURA 3-4 Cuando el agua se congela** su entropía disminuye, porque las moléculas de agua del hielo existen en un estado más ordenado. La gran cantidad de enlaces de hidrógeno que se encuentran en el hielo favorece la entalpía de la transición agua-hielo, mientras que la entropía reducida hace que la transición sea desfavorable. Dado que la contribución entrópica a la energía libre también depende de la temperatura, predomina a temperaturas más altas y hace que el agua líquida sea más favorable. A temperaturas más bajas, el término entrópico de la energía libre se vuelve de menor magnitud, hasta que eventualmente la entalpía favorable de los enlaces de hidrógeno se hace dominante, punto en el cual el hielo se vuelve más favorable energéticamente que el agua líquida.

FUENTE: Este trabajo está autorizado bajo la licencia Creative Commons Attribution ShareAlike 3.0.

**TABLA 3-1 Termodinámica de la transformación agua-hielo**

| Temp. (°C) | $\Delta E$ (cal/mol) | $\Delta H$ (cal/mol) | $\Delta S$ (cal/mol·°C) | $T\Delta S$ (cal/mol) | $\Delta G$ (cal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|
| −10 | −1 343 | −1 343 | −4.9 | −1 292 | −51 |
| 0 | −1 436 | −1 436 | −5.2 | −1 436 | 0 |
| +10 | −1 529 | −1 529 | −5.6 | −1 583 | 154 |

*Fuente:* I. M. Klotz, *Energy Changes in Biochemical Reactions*, Academic Press; 1967. Con permiso de Elsevier.

### Cambios de energía libre en las reacciones químicas

Ahora que se ha discutido el concepto de energía libre en términos generales, puede aplicarse la información a las reacciones químicas dentro de la célula. Todas las reacciones químicas dentro de la célula son reversibles, y por tanto deben considerarse dos reacciones que ocurren simultáneamente, una en sentido directo y la otra en sentido inverso. De acuerdo con la ley de acción de masas, la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración de los reactivos. Considérese, por ejemplo, la siguiente reacción:

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

La velocidad de la reacción directa es directamente proporcional al producto de las concentraciones molares de A y B. La velocidad de la reacción directa se puede expresar como $k_1[A][B]$, donde $k_1$ es la constante de velocidad para la reacción directa. La velocidad de la reacción hacia atrás es igual a $k_2[C][D]$. Todas las reacciones químicas proceden, aunque sea muy lentamente, hacia un estado de equilibrio; es decir, hacia un punto en el que las velocidades de las reacciones hacia delante y hacia atrás son iguales. En el equilibrio, el mismo número de moléculas A y B se convierten en moléculas C y D por unidad de tiempo a medida que se forman a partir de ellas. En el equilibrio, por tanto,

$$k_1[A][B] = k_2[C][D]$$

que puede reordenarse como

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

En otras palabras, en el equilibrio hay una relación predecible entre la concentración de productos y la concentración de reactivos. Esta relación, que es igual a $k_1/k_2$, se denomina **constante de equilibrio, $K_{eq}$.**

La constante de equilibrio permite predecir la dirección (de avance o retroceso) en la que se favorece la reacción bajo un con-

junto dado de condiciones. Supongamos, por ejemplo, que estamos estudiando la reacción anterior, y que acabamos de mezclar los cuatro componentes (A, B, C, D) para que cada uno esté presente en una concentración inicial de 0.5 M.

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{[0.5][0.5]}{[0.5][0.5]} = 1$$

La dirección en la cual esta reacción procederá depende de la constante de equilibrio. Si la $K_{eq}$ es mayor que 1, la reacción avanzará a una velocidad mayor hacia la formación de los productos C y D que en la dirección inversa. Por ejemplo, si el $K_{eq}$ resulta ser 9.0, entonces la concentración de los reactivos y productos en equilibrio en esta mezcla de reacción particular será 0.25 M y 0.75 M, respectivamente.

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{[0.75][0.75]}{[0.25][0.25]} = 9$$

Si, por otro lado, la $K_{eq}$ es menor que 1, la reacción inversa procederá a una velocidad mayor que la reacción directa, de modo que aumentará la concentración de A y B a expensas de C y D. De estos puntos se deduce que la dirección neta en la que avanza la reacción en cualquier momento depende de las concentraciones relativas de todas las moléculas participantes, y se puede predecir a partir de la $K_{eq}$. Si se conoce la ecuación de $K_{eq}$ para la reacción, se puede calcular con ella si la reacción avanzará o retrocederá, añadiendo las concentraciones reales de todos los reactivos y productos, y comparando luego este valor con el valor esperado de la $K_{eq}$. Si el resultado es igual a la $K_{eq}$, entonces la reacción ya está en equilibrio. Sin embargo, si el resultado es menor que la $K_{eq}$, la reacción avanzará hacia la formación del producto.

Hay un tipo especial de constante de equilibrio que vale la pena mencionar: la **constante de disociación**, denotada $K_d$. La constante de disociación refleja en qué medida dos moléculas tienden a permanecer juntas. Dadas dos moléculas A y B, por ejemplo una proteína A que se une a un ligando B, la reacción es

$$AB \rightleftharpoons A + B$$

donde AB es el complejo de A enlazado a B. Habitualmente esto se refiere a una interacción no covalente. Para esta reacción, la constante de equilibrio se denomina constante de disociación y se define como:

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

donde [AB] denota la concentración de A ligada a B, mientras que [A] y [B] son las concentraciones de A y B libres (no ligados). Al examinar la ecuación que define $K_d$, se puede ver que cuanto menor sea $K_d$ mayor será [AB] con relación a [A] y [B]. Por tanto, si un químico farmacéutico quisiera clasificar una serie de inhibidores por su capacidad para unir una proteína particular, podría medir la $K_d$, y el inhibidor con la $K_d$ más pequeña sería el que se una más estrechamente.

Volvamos al tema de la energía. La relación de reactivos a productos presentes en equilibrio está determinada por los niveles relativos de energía libre de los reactivos y productos. Siempre que la energía libre total de los reactivos sea mayor que la energía libre total de los productos, entonces $\Delta G$ tiene un valor negativo y la reacción avanza en la dirección de la formación de los productos. Cuanto mayor es $\Delta G$, más lejos está la reacción del equilibrio y más trabajo puede realizar el sistema. A medida que avanza la reacción, la diferencia en el contenido de energía libre entre los reactivos y los productos disminuye ($\Delta G$ se vuelve menos negativa), hasta que en el equilibrio la diferencia es cero ($\Delta G = 0$) y no se puede obtener más trabajo.

Debido a que $\Delta G$ para una reacción dada depende de la mezcla reactiva presente en un momento dado, no es un término útil para comparar la energía de varias reacciones. Para colocar las reacciones en una base comparable y permitir varios tipos de cálculos, se ha adoptado una convención para considerar el cambio de energía libre que ocurre durante una reacción bajo un conjunto de *condiciones estándar*. Para las reacciones bioquímicas, las condiciones se ajustan arbitrariamente a 25 °C (298 K) y 1 atm de presión, con todos los reactivos y productos presentes a 1.0 M de concentración a excepción del agua, que está presente a 55.6 M, y $H^+$ en $10^{-7}$ M (pH 7.0).[2] La **variación estándar de energía libre** ($\Delta G°'$) describe la energía libre liberada cuando los reactivos se convierten en productos bajo estas condiciones estándar. Se debe tener en cuenta que las condiciones estándar no prevalecen en la célula y, por tanto, hay que ser cauteloso en el uso de valores para las diferencias estándar de energía libre en los cálculos de la energética celular.

La relación entre la constante de equilibrio y el cambio de energía libre estándar viene dada por la ecuación

$$\Delta G°' = -RT \ln K'_{eq}$$

Cuando el log natural (ln) se convierte en $\log_{10}$, la ecuación se convierte en

$$\Delta G°' = -2.303RT \log K'_{eq}$$

donde $R$ es la constante de los gases (1.987 cal/mol · K) y $T$ es la temperatura absoluta (298 K).[3] Recuerde que el log de 1.0 es cero. En consecuencia, de la ecuación anterior se deduce que las reacciones que tienen constantes de equilibrio mayores que 1.0 tienen valores negativos de $\Delta G°'$, lo que indica que en condiciones estándar pueden ocurrir espontáneamente. Las reacciones que tienen constantes de equilibrio menores que 1 tienen valores positivos de $\Delta G°'$ y no pueden ocurrir espontáneamente en condiciones estándar. En otras palabras, dada una reacción escrita de la siguiente forma: A + B $\rightleftharpoons$ C + D, si $\Delta G°'$ es negativo la reacción avanzará hacia la derecha cuando los reaccionantes y los productos estén todos presentes en una concentración de 1.0 M a pH 7. Cuanto mayor sea el valor negativo, más avanzará la reacción a la derecha antes de alcanzar el equilibrio. Bajo las mismas condiciones, si el $\Delta G°'$ es positivo, la reacción avanzará hacia la izquierda; es decir, se favorece la reacción inversa. La relación entre $\Delta G°'$ y $K'_{eq}$ se muestra en la tabla 3-2.

## Cambios de energía libre en las reacciones metabólicas

Una de las reacciones químicas más importantes en la célula es la hidrólisis del ATP (véase **FIGURA 3-5**). En la reacción

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$$

la diferencia de energía libre estándar entre los productos y los reactivos es −7.3 kcal/mol. Con base en esta información es evidente que la hidrólisis del ATP es una reacción altamente favorable (exergónica), es decir, una que tiende a un gran cociente [ADP]/[ATP] en el equilibrio. Hay varias razones por las cuales esta reacción es tan favorable, una de las cuales es evidente en la figura 3-5. La repulsión electrostática creada por cuatro cargas

[2] $\Delta G°'$ indica condiciones estándar que incluyen pH 7, mientras que $\Delta G°$ indica condiciones estándar en 1.0$M$ $H^+$ (pH 0.0). La designación $K'_{eq}$ también indica una mezcla de reacción a pH 7.

[3] El lado derecho de esta ecuación es equivalente a la cantidad de energía libre que se pierde a medida que la reacción avanza desde las condiciones estándar hasta el equilibrio.

**TABLA 3-2 Relación entre $\Delta G^{\circ\prime}$ y $K'_{eq}$ a 25 °C**

| $K'_{eq}$ | $\Delta G^{\circ\prime}$ (kcal/mol) |
|---|---|
| $10^6$ | −8.2 |
| $10^4$ | −5.5 |
| $10^2$ | −2.7 |
| $10^1$ | −1.4 |
| $10^0$ | 0.0 |
| $10^{-1}$ | 1.4 |
| $10^{-2}$ | 2.7 |
| $10^{-4}$ | 5.5 |
| $10^{-6}$ | 8.2 |

negativas poco espaciadas en $ATP^{4-}$ se alivia parcialmente mediante la formación de $ADP^{3-}$.

Es importante tener clara la diferencia entre $\Delta G$ y $\Delta G^{\circ\prime}$. El $\Delta G^{\circ\prime}$ es un valor fijo para una reacción dada, e indica la dirección en la que esa reacción procedería si el sistema estuviera en condiciones estándar. Debido a que las condiciones estándar no prevalecen dentro de una célula, los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ no se pueden usar para predecir la dirección en la cual una reacción particular está procediendo en un momento dado, dentro de un compartimiento celular particular. Para hacer esto, debe conocerse el $\Delta G$, que está determinado por las concentraciones de los reactivos y productos que están presentes en el momento. A 25 °C,

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + 2.303RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + 2.303(1.987 \text{cal/mol} \cdot \text{K})(298 \text{ K}) \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

[A], [B], [C] y [D] son las concentraciones reales en ese momento. El cálculo de $\Delta G$ revela la dirección en la que se está produciendo la reacción en la célula, y cuán cerca está de equilibrarse la reacción particular en cuestión. Por ejemplo, las concentraciones celulares típicas de los reactivos y productos en la reacción para la hidrólisis de ATP pueden ser [ATP] = 10 mM; [ADP] = 1 mM; [Pi] = 10 mM. Sustituyendo estos valores en la ecuación,

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + 2.303RT \log \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]}$$

$$\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[10^{-3}][10^{-2}]}{[10^{-2}]}$$

$$\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol})(-3)$$

$$\Delta G = -11.5 \text{ kcal/mol (o } -46.2 \text{ kJ/mol)}$$

Así, aunque el $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis de ATP es −7.3 kcal/mol, el $\Delta G$ típico en la célula para esta reacción es aproximadamente −12 kcal/mol, porque una célula mantiene una alta relación de [ATP]/[ADP]. Este hecho ilustra una manera útil de pensar sobre $\Delta G$, como un número que describe cuán lejos está un sistema del equilibrio. El ATP es una molécula de alta energía porque la proporción de ATP a ADP está muy lejos de su valor de equilibrio.

Las células llevan a cabo muchas reacciones con valores positivos de $\Delta G^{\circ}$ porque las concentraciones relativas de reactivos y productos favorecen el progreso de las reacciones. Esto puede suceder de dos maneras. La primera ilustra la importante diferencia entre $\Delta G$ y $\Delta G^{\circ\prime}$, y la segunda revela la manera en que la entrada de energía química almacenada induce en la célula reacciones con valores positivos de $\Delta G^{\circ\prime}$.

Considérese la reacción de la glucólisis (véase figura 3-24) en la que el dihidroxiacetona fosfato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato. El $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción es +1.8 kcal/mol; sin embargo, la formación del producto de esta reacción tiene lugar en la célula. La reacción procede porque otras reacciones celulares mantienen la relación del reaccionante al producto por encima de la definida por la constante de equilibrio. Mientras esta condición se mantenga, el $\Delta G$ será negativo, y la reacción continuará espontáneamente en la dirección de formación del gliceraldehído 3-fosfato. Esto trae a colación una característica importante del metabolismo celular: a saber, que reacciones específicas no se pueden considerar como independientes, como si estuvieran ocurriendo de forma aislada en un tubo de ensayo. Cientos de reacciones ocurren simultáneamente en una célula. Todas estas están interrelacionadas, porque el producto de una reacción se convierte en un reaccionante para la próxima reacción de la secuencia, y así

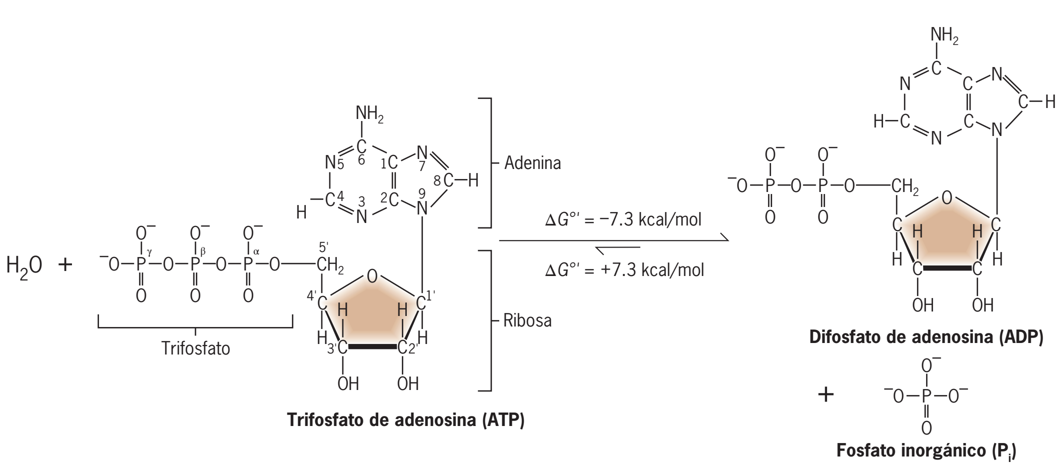



**FIGURA 3-5 Hidrólisis del ATP**. El trifosfato de adenosina (ATP) se hidroliza como parte de muchos procesos bioquímicos. En la mayoría de las reacciones, como aquí se muestra, el ATP se hidroliza a ADP y fosfato inorgánico ($P_i$, *inorganic phosphate*); pero en algunos casos (no mostrados) se hidroliza a monofosfato de adenosina (AMP, *adenosine monophosphate*) un compuesto con un solo grupo fosfato y pirofosfato ($PP_i$). Ambas reacciones tienen esencialmente el mismo $\Delta G^{\circ\prime}$ de −7.3 kcal/mol (−30.5 kJ/mol).

sucesivamente a lo largo de una secuencia metabólica y la siguiente. Para mantener la producción de gliceraldehído 3-fosfato a expensas del dihidroxiacetona fosfato, la reacción se sitúa dentro de una secuencia metabólica de forma tal que el producto se elimina por la siguiente reacción en la secuencia, a una velocidad suficiente como para mantener una proporción favorable de las concentraciones de estas dos moléculas.

**REPASO**

1. Discuta las diferencias entre ΔG y ΔG0; entre las fracciones relativas de las reacciones directa e inversa cuando $\Delta G$ es negativo, cero o positivo. ¿Cuál es la relación entre $\Delta G°'$ y K′eq? ¿Cómo puede una célula llevar a cabo una reacción que tiene un $+\Delta G°'$?
2. ¿Cómo es posible que una célula mantenga una relación [ATP]/[ADP] mayor que 1? ¿Cómo difiere esta relación de la esperada en el equilibrio?
3. ¿Cómo es que la formación de hielo no tiene lugar a temperaturas superiores a 0 °C?

## 3.3 Acoplamiento de reacciones endergónicas y exergónicas

Las reacciones con grandes valores positivos de $\Delta G°$ son típicamente impulsadas por la entrada de energía. Considérese la formación del aminoácido glutamina a partir del ácido glutámico por la enzima glutamina sintetasa:

ácido glutámico + $NH_3$ → glutamina $\Delta G°' = +3.4$ kcal/mol

Esta reacción endergónica tiene lugar en la célula porque el ácido glutámico se convierte realmente en glutamina en dos reacciones secuenciales, ambas son exergónicas:

1a. reacción: ácido glutámico + ATP → glutamilfosfato + ADP
2a. reacción: glutamilfosfato + $NH_3$ → glutamina + $P_1$

Reacción total: ácido glutámico + ATP + $NH_3$ → glutamina + ADP + $P_i$
$\Delta G°' = -3.9$ kcal/mol

Se dice que la formación de glutamina está *acoplada* a la hidrólisis del ATP. Siempre que el valor de $\Delta G$ para la hidrólisis del ATP sea más negativo que el $\Delta G$ positivo para la síntesis de la glutamina a partir del ácido glutámico, la reacción de hidrólisis de ATP "cuesta abajo" se puede usar para impulsar la síntesis "cuesta arriba" de la glutamina. Para acoplar las dos reacciones químicas, el producto de la primera reacción se convierte en el reaccionante para la segunda. El puente entre las dos reacciones, —el glutamilfosfato en este caso— se denomina *intermediario común*. En esencia, lo que ocurre es que la hidrólisis exergónica del ATP se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso, el ácido glutámico actúa como un aceptor del grupo fosfato, que es desplazado por el $NH_3$ en el segundo paso.

La hidrólisis del ATP se puede usar en la célula para dar origen a reacciones que conducen a la formación de moléculas como la glutamina porque los niveles de ATP se mantienen mucho más altos (con relación a los del ADP) de lo que estarían en el equilibrio. Esto se puede demostrar con el siguiente cálculo. Como se indicó anteriormente, una concentración celular típica de $P_i$ podría ser 10 mM. Para calcular la relación de equilibrio [ADP]/[ATP] en estas condiciones, se puede establecer $\Delta G$ en el valor de equilibrio de 0 y resolver la siguiente ecuación (tomada de la página 87) para [ADP]/[ATP]:

$$\Delta G = \Delta G°' + (1.4\ \text{kcal/mol})\log\frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

$$0 = -7.3\text{kcal/mol} + (1.4\,\text{kcal/mol})\log\frac{[\text{ADP}][10^{-2}]}{[\text{ATP}]}$$

$$0 = -7.3\ \text{kcal/mol} + (1.4\,\text{kcal/mol})\left(\log 10^{-2} + \log\frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]}\right)$$

$$7.3\ \text{kcal/mol} = (1.4\,\text{kcal/mol})(-2) + (1.4\,\text{kcal/mol})\log\frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]}$$

$$\log\frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]} = \frac{10.1\,\text{kcal/mol}}{1.4\,\text{kcal/mol}} = 7.2$$

$$\frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]} = 1.6\times 10^{7}$$

Por tanto, en el equilibrio, se esperaría que la concentración de ADP sea más de $10^7$ veces mayor que la del ATP, pero de hecho las concentraciones de ATP en la mayoría de las células son de 10 a 100 veces mayores que las del ADP. Este es un punto crucial porque son las concentraciones relativas de ATP y ADP las que importan. Si una célula fuera a contener una mezcla de equilibrio de ATP, ADP y $P_i$, no importaría la cantidad de ATP presente; la célula no tendría capacidad para realizar trabajo.

La hidrólisis del ATP se utiliza para controlar la mayoría de los procesos endergónicos dentro de la célula, incluidas reacciones químicas como la que acabamos de describir, la separación de carga a través de una membrana, la concentración de un soluto, el movimiento de filamentos en una célula muscular y cambios en las propiedades de las proteínas (consúltese **FIGURA 3-6**). El ATP se puede usar para procesos tan diversos porque su grupo terminal de fosfato se puede transferir a una variedad de diferentes tipos de moléculas, que incluyen aminoácidos, azúcares, lípidos y proteínas. En la mayoría de las reacciones acopladas, el grupo fosfato se transfiere en un paso inicial del ATP a uno de estos aceptores, y posteriormente se elimina en un segundo paso (véase figura 4-46 como ejemplo).

**REPASO**

1. ¿Cuál es el papel de un intermediario común en la inducción de una reacción química desfavorable?

## 3.4 Equilibrio *versus* metabolismo de estado estacionario

A medida que las reacciones tienden al equilibrio, la energía libre disponible para hacer el trabajo disminuye hacia un mínimo y la entropía aumenta hacia un máximo. Por tanto, cuanto más lejos se mantiene una reacción de su estado de equilibrio, se pierde menos de su capacidad de hacer trabajo a causa del aumento de entropía. El metabolismo celular es esencialmente metabolismo de no equilibrio; es decir, se caracteriza por relaciones de desequilibrio entre productos y reaccionantes. Esto no quiere decir que algunas reacciones no ocurran en el equilibrio, o cerca de él, dentro de las células. De hecho, muchas de las reacciones de una secuencia metabólica pueden estar cerca del equilibrio (obsérvese figura 3-25). Sin embargo, al menos una, y a menudo varias reacciones en una secuencia, están lejos del equilibrio, haciéndose esencialmente irreversibles. Estas son las reacciones que mantienen la secuencia en una sola dirección. Son, asimismo, las que están sujetas a la regulación celular, debido a que la estimulación o la inhibición de la actividad de las enzimas que catalizan estas

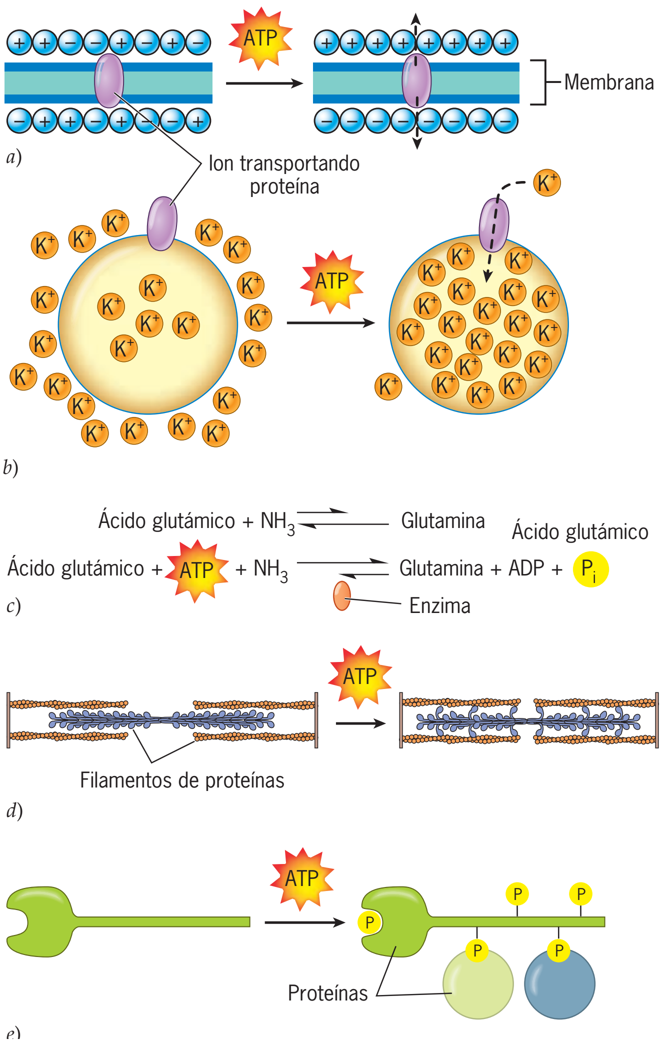



**FIGURA 3-6 Algunas funciones para la hidrólisis del ATP**. En la célula, la energía de la hidrólisis de ATP se puede usar para *a*) separar la carga a través de una membrana; *b*) concentrar un soluto particular dentro de la célula; *c*) promover una reacción química, por lo demás desfavorable; *d*) deslizar filamentos entre sí, como ocurre durante el acortamiento de una célula muscular; *e*) donar un grupo fosfato a una proteína, y así cambiar sus propiedades y producir la respuesta deseada. En este caso, los grupos de fosfato añadidos sirven como sitios de unión para otras proteínas.

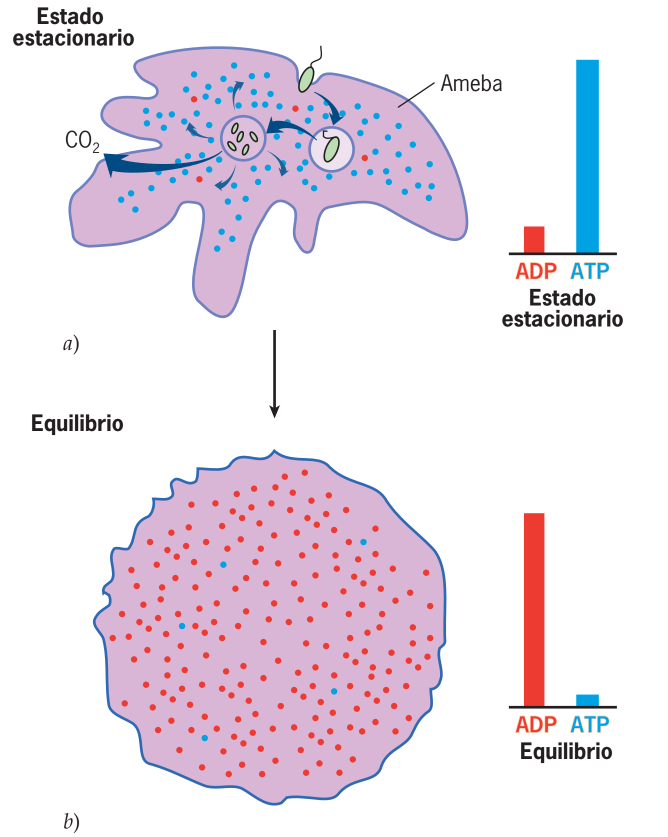



**FIGURA 3-7 Equilibrio *versus* metabolismo de estado estacionario**. *a*) Mientras esta ameba pueda continuar recibiendo nutrientes del mundo exterior, podrá cosechar la energía necesaria para mantener las concentraciones de compuestos en un estado estable, que puede estar lejos del equilibrio. Las concentraciones de ATP y ADP en estado estacionario se indican con puntos de color y el histograma. *b*) Cuando la ameba muere, las concentraciones de ATP y ADP (así como otros productos bioquímicos) cambian hacia sus proporciones de equilibrio.

reacciones puede aumentar o reducir el flujo de materiales por toda la vía.

Los principios básicos de la termodinámica se formularon utilizando sistemas *cerrados*, no vivos (sin intercambio de materia entre el sistema y su entorno), en condiciones de equilibrio reversible. Las características únicas del metabolismo celular requieren una perspectiva diferente. El metabolismo celular se puede mantener en condiciones irreversibles y de no equilibrio porque, a diferencia del entorno dentro de un tubo de ensayo, la célula es un sistema *abierto*. Los materiales y la energía fluyen continuamente a la célula desde el torrente sanguíneo o el medio de cultivo. El alcance de esta entrada en las células desde el exterior se hace evidente si simplemente se aguanta la respiración. Dependemos minuto a minuto de una fuente externa de oxígeno, porque el oxígeno es un reactivo muy importante en el metabolismo celular. El flujo continuo de oxígeno y otros materiales hacia dentro y fuera de las células permite que el metabolismo celular exista en un **estado estacionario** (véase **FIGURA 3-7**). En estado estacionario las concentraciones de reaccionantes y productos permanecen relativamente constantes, a pesar de que las reacciones individuales no están necesariamente en equilibrio. Esto no sugiere que las concentraciones de metabolitos celulares no varíen. Las células son capaces de ajustar continuamente la concentración de sustancias clave en respuesta a las condiciones cambiantes. Un aumento o disminución en el nivel de sustancias reguladoras como la hormona insulina, por ejemplo, puede causar un notable aumento o disminución en la producción de azúcares, aminoácidos o grasas. En otras palabras, las células existen en un estado de desequilibrio *dinámico*, en el cual las velocidades de reacción hacia adelante y hacia atrás se pueden aumentar o disminuir instantáneamente en respuesta a condiciones cambiantes.

**REPASO**

1. ¿Qué define un sistema cerrado? ¿Son las células sistemas cerrados?

## 3.5 Las enzimas como catalizadores biológicos

A finales del siglo XIX se debatía si el proceso de formación de etanol requería la presencia de células de levadura intactas. En un lado del debate estaba el químico orgánico Justus von Liebig, quien sostenía que las reacciones de fermentación que producían

el alcohol no eran diferentes de los tipos de reacciones orgánicas que había estado estudiando en el tubo de ensayo. Por otra parte estaba el biólogo Louis Pasteur, quien argumentó que el proceso de fermentación solo podía ocurrir dentro de los confines de una célula viva intacta y altamente organizada.

En 1897, dos años después de la muerte de Pasteur, el bacteriólogo Hans Büchner y su hermano Eduard, químico, preparaban "jugo de levadura", un extracto que hacían moliendo células de levadura con granos de arena y luego colando la mezcla a través de papel de filtro; ellos querían conservar el jugo de levadura para un uso posterior. Después de intentar preservar el extracto con antisépticos y fracasar, trataron de proteger la preparación del deterioro añadiendo azúcar, el mismo procedimiento utilizado para conservar mermeladas y jaleas. En lugar de preservar la solución, el jugo de levadura producía gas del azúcar y burbujeaba continuamente durante días. Después de un análisis posterior, Eduard Büchner descubrió que la fermentación estaba produciendo etanol y burbujas de dióxido de carbono. Había demostrado que la fermentación no requería la presencia de células intactas.

Sin embargo, pronto se encontró que la fermentación era muy diferente de los tipos de reacciones llevadas a cabo por los químicos orgánicos. La fermentación requería la presencia de un conjunto único de catalizadores que no tenían contrapartida en el mundo no vivo. Estos catalizadores se llamaron **enzimas** (del griego ἐν, en, y ζύμη levadura). Las enzimas son los mediadores del metabolismo, responsables de prácticamente cada reacción que ocurre en una célula. Sin las enzimas, las reacciones metabólicas avanzarían tan lentamente que serían imperceptibles.

La primera evidencia de que las enzimas son proteínas se obtuvo en 1926 por James Sumner de la Universidad de Cornell, cuando cristalizó la enzima ureasa en la *Canavalia ensiformis* y determinó su composición. Aunque este hallazgo no fue recibido en el momento con mucha aprobación positiva, pronto se demostró que varias otras enzimas eran proteínas, y en las siguientes décadas se aceptó que todos los catalizadores biológicos eran proteínas. Eventualmente se hizo evidente que ciertas reacciones biológicas son catalizadas por moléculas de RNA. En aras de la claridad, el término *enzima* aún se reserva por lo general para catalizadores proteicos, mientras que el término *ribosoma* se usa para catalizadores de RNA. El presente capítulo restringe la discusión a los catalizadores de proteínas; las propiedades de los catalizadores de RNA se discuten en el capítulo 11.

Aunque las enzimas son proteínas, muchas de ellas son proteínas conjugadas; es decir, contienen componentes no proteicos llamados **cofactores**, que pueden ser inorgánicos (metales) u orgánicos (**coenzimas**). Las vitaminas y sus derivados a menudo funcionan como coenzimas. Cuando están presentes, los cofactores son copartícipes importantes en el funcionamiento de la enzima, llevando a cabo a menudo actividades para las cuales los aminoácidos no son adecuados. Por ejemplo, como se discutió en el capítulo anterior, en la mioglobina el átomo de hierro de un grupo hem es el sitio donde se une el oxígeno y se almacena hasta que lo requiere el metabolismo celular.

## Propiedades de las enzimas

Como es cierto para todos los catalizadores, las enzimas exhiben las siguientes propiedades: 1) solo se requieren en pequeñas cantidades; 2) no se alteran irreversiblemente durante el curso de la reacción y, por tanto, cada molécula de enzima puede participar repetidamente en reacciones individuales, y 3) no tienen efecto alguno sobre la termodinámica de la reacción. Este último punto es de particular importancia. Las enzimas no suministran energía para una reacción química, y por tanto no determinan si una reacción es termodinámicamente favorable o desfavorable. De manera similar, las enzimas no determinan la relación de productos a reaccionantes en el equilibrio. Estas son propiedades inherentes de los productos químicos que reaccionan. Como catalizadores, las enzimas solo pueden acelerar la velocidad a la que se produce una reacción química favorable.

No existe una relación de dependencia entre la magnitud del $\Delta G$ para una reacción particular y la velocidad a la que tiene lugar dicha reacción. La magnitud de $\Delta G$ solo nos informa de la diferencia en energía libre entre el estado inicial y el equilibrio. Es totalmente independiente de la ruta o el tiempo que lleva alcanzar el equilibrio. Por ejemplo, la oxidación de la glucosa es un proceso muy favorable, como se puede determinar por la cantidad de energía liberada durante su combustión. Sin embargo, los cristales de glucosa se pueden dejar al aire en una habitación de forma prácticamente indefinida sin una conversión notable en materiales menos energéticos. En otras palabras, la glucosa es *cinéticamente* estable, aun cuando es *termodinámicamente* inestable. Incluso si el azúcar se disuelve, siempre que la solución se mantenga estéril no se deteriorará rápidamente. Sin embargo, si se agregan algunas bacterias, las células absorberán el azúcar y la degradarán enzimáticamente en un corto periodo.

Las enzimas son catalizadores notablemente expertos. Los catalizadores empleados por los químicos orgánicos en el laboratorio, como el ácido, el platino metálico y el magnesio, por lo general aceleran las reacciones de 100 a 1 000 veces por encima la velocidad no catalizada. En contraste, las enzimas suelen aumentar la velocidad de una reacción de $10^8$ a $10^{13}$ veces, o más (véase tabla 3-3). Sobre la base de estos números, las enzimas pueden lograr en un segundo lo que requeriría de tres a 300 000 años si la enzima estuviera ausente. Aún más notable, logran esta hazaña a la temperatura y pH moderados que se encuentran dentro de una célula. Además, a diferencia de los catalizadores inorgánicos utilizados por los químicos, las enzimas son altamente específicas para los reaccionantes a los que se pueden unir y a la reacción que pueden catalizar. Los reaccionantes enlazados por una enzima se llaman **sustratos**. Si por ejemplo la enzima hexoquinasa está presente en solución con un centenar de compuestos de bajo peso molecular, además de su sustrato glucosa, solo las moléculas de glucosa serán reconocidas por la enzima y se someterán a reacción. Para todos los fines prácticos, todos los otros compuestos podrían estar ausentes. Este tipo de especificidad, ya sea entre enzimas y sustratos, u otros tipos de proteínas y las sustancias a las que se unen, es crucial para mantener el orden requerido para sostener la vida.

Además de su alto nivel de actividad y especificidad, las enzimas actúan como directores de tráfico metabólico en el sentido de que las reacciones catalizadas por enzimas son muy ordenadas; los únicos productos formados son los apropiados. Esto es muy importante porque la formación de subproductos químicos afectaría rápidamente la vida de una frágil célula. Finalmente, a diferencia de otros catalizadores, la actividad de las enzimas se puede regular para satisfacer las necesidades particulares de la célula en un momento particular. Como se hará evidente en este capítulo y en el resto del texto, las enzimas de una célula son en realidad una maravillosa colección de máquinas moleculares en miniatura.

## Superación de la barrera de la energía de activación

¿Cómo pueden las enzimas lograr una catálisis tan eficaz? La primera pregunta a considerar es por qué las reacciones termodinámicamente favorables no proceden por sí solas a velocidades relativamente rápidas en ausencia de enzimas. Incluso el ATP, cuya hidrólisis es tan favorable, es estable en una célula hasta que se descompone en una reacción enzimática controlada. Si este no fuera el caso, el ATP tendría poco uso biológico.

Las transformaciones químicas requieren que ciertos enlaces covalentes se rompan dentro de los reaccionantes. Para que esto

**TABLA 3-3 Actividad catalítica de una variedad de enzimas**

| Enzima | $t_{1/2}$[1] no enzimática[1] | Número de recambio[2] | Incremento de velocidad[3] |
|---|---|---|---|
| OMP descarboxilasa | 78 000 000 años | 39 | $1.4 \times 10^{17}$ |
| Nucleasa estafilocócica | 130 000 años | 95 | $5.6 \times 10^{14}$ |
| Adenosina deaminasa | 120 años | 370 | $2.1 \times 10^{12}$ |
| Nucleosidasa AMP | 69 000 años | 60 | $6.0 \times 10^{12}$ |
| Citidina deaminasa | 69 años | 299 | $1.2 \times 10^{12}$ |
| Fosfotriesterasa | 2.9 años | 2 100 | $2.8 \times 10^{11}$ |
| Carboxipeptidasa A | 7.3 años | 578 | $1.9 \times 10^{11}$ |
| Quetosteroide isomerasa | 7 semanas | 66 000 | $3.9 \times 10^{11}$ |
| Triosafosfato isomerasa | 1.9 días | 4,300 | $1.0 \times 10^{9}$ |
| Corismato mutasa | 7.4 horas | 50 | $1.9 \times 10^{6}$ |
| Anhidrasa carbónica | 5 segundos | $1 \times 10^{6}$ | $7.7 \times 10^{6}$ |
| Ciclofilina, humana | 23 segundos | 13 000 | $4.6 \times 10^{5}$ |

[1] Tiempo a transcurrir para que la mitad de los reaccionantes se convirtiera en producto en ausencia de enzima.
[2] Número de reacciones catalizadas por una sola molécula de enzima por segundo cuando se opera a una concentración de sustrato saturante.
[3] Aumento en la velocidad de reacción alcanzada por la reacción catalizada por enzimas sobre la reacción no catalizada.

*Fuente:* A. Radzicka y R. Wolfenden. *Science* 1995;267:91. Copyright 1995. Reproducido con permiso de AAAS.

ocurra, los reaccionantes deben contener suficiente energía cinética (energía de movimiento) que superen una barrera, **llamada energía de activación ($E_A$)**. Esto se expresa en forma de diagrama en la **FIGURA 3-8**, donde la energía de activación se representa por la altura de las curvas. Los reaccionantes en una reacción química a menudo se comparan con un objeto que descansa sobre un acantilado listo para sumergirse en el fondo. Si se deja solo, el objeto con toda probabilidad permanecería allí indefinidamente. Sin embargo, si alguien viniera y le proporcionara suficiente energía para vencer la fricción, u otra pequeña barrera en su camino, e hiciera que alcanzara el borde del acantilado, el objeto caería espontáneamente al fondo.

El objeto tiene el potencial de caer a un estado de energía inferior una vez que se han eliminado las barreras cinéticas. En una disolución a temperatura ambiente, las moléculas existen en un estado de movimiento aleatorio, y cada una de ellas posee una cierta cantidad de energía cinética en un instante dado. En una población de moléculas, su energía se distribuye en una curva en forma de campana (véase **FIGURA 3-9**), algunas tienen muy poca energía y otras mucha más. Las moléculas de alta energía (moléculas activadas) permanecen como tales solo por un breve tiempo, pasando su exceso de energía a otras moléculas mediante colisiones. Considérese una reacción en la que una molécula reaccionante se divide en dos moléculas producto. Si una determinada molécula reaccionante adquiere suficiente energía para superar la barrera de activación, existe la posibilidad de que se divida en las dos moléculas del producto. La velocidad de la reacción depende del número de moléculas reactivas que poseen

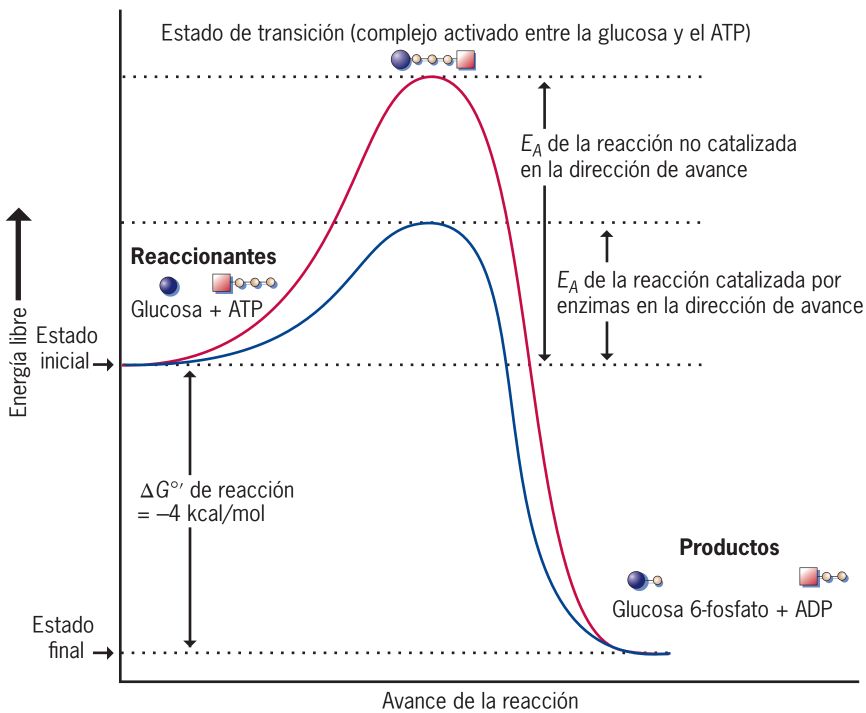



**FIGURA 3-8 Energía de activación y reacciones enzimáticas.** Aunque la formación de glucosa 6-fosfato es una reacción termodinámicamente favorecida ($\Delta G^{\circ\prime}$ = –4 kcal/mol), los reaccionantes deben poseer energía suficiente para lograr un estado activado en el que se puedan producir los reordenamientos atómicos necesarios para la reacción. La cantidad de energía requerida se llama energía de activación ($E_A$) y está representada por altura de la curva. La energía de activación no es un valor fijo, sino que varía con la secuencia de reacción particular. $E_A$ se reduce mucho cuando los reaccionantes se combinan con un catalizador de enzima. (Este diagrama muestra un mecanismo de reacción simple de un solo paso). Muchas reacciones enzimáticas tienen lugar en dos o más pasos que conducen a la formación de intermediarios (como en la figura 3-13). Cada paso de la reacción tiene una $E_A$ diferente y un estado de transición separado.

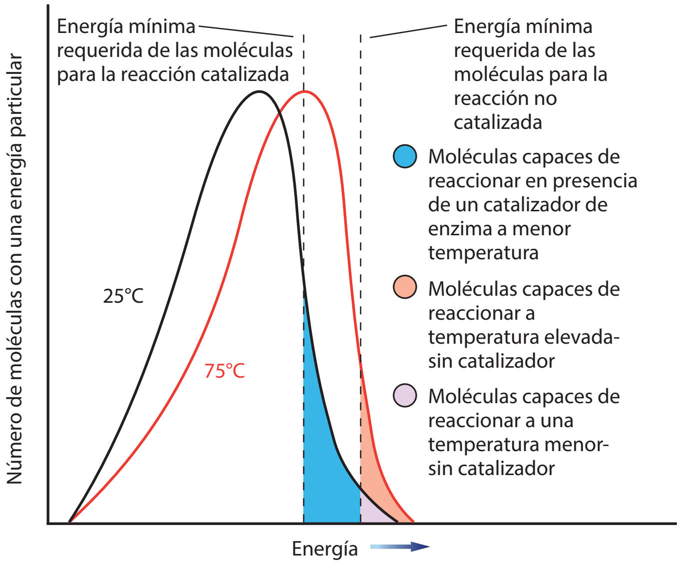
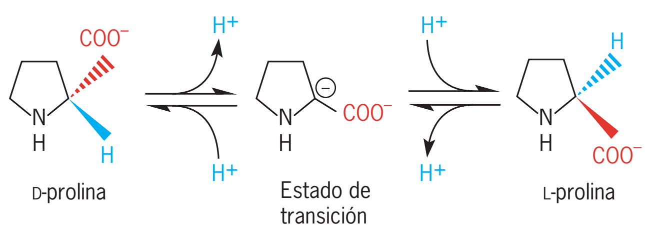



**FIGURA 3-9 El efecto de reducir la energía de activación en la velocidad de una reacción.** Las curvas en forma de campana indican el contenido de energía de una población de moléculas presente en una mezcla reaccionante a dos temperaturas diferentes. El número de moléculas reactivas que contienen suficiente energía para experimentar la reacción se incrementa calentando la mezcla o añadiendo un catalizador enzimático. El calor incrementa la velocidad de reacción al aumentar el contenido de energía de las moléculas para que una fracción más grande tenga energía suficiente para superar la barrera de energía de activación (curvas rojas *versus* azules), mientras que la enzima lo hace al disminuir la energía de activación requerida para que ocurra la reacción (líneas de puntos verticales).

la energía cinética necesaria en un momento dado. Una forma de aumentar la velocidad de reacción es aumentar la energía de los reaccionantes. Esto se hace más fácilmente en el laboratorio calentando la mezcla de reacción (consúltese figura 3-9). Por el contrario, la aplicación de calor a una reacción mediada por enzimas conduce a la inactivación rápida de la enzima debido a su desnaturalización.

Se dice que los reaccionantes están en el estado de transición cuando están en la cresta de la curva de energía y listos para convertirse en productos (véase figura 3-8). En este punto, los reaccionantes han formado un complejo momentáneo y activado en el que los enlaces se forman y se rompen. Es posible ilustrar la naturaleza de una estructura en estado de transición examinando la interconversión de los estereoisómeros D y L de la prolina, una reacción catalizada por la enzima bacteriana prolina racemasa.




Esta reacción tiene lugar en cualquier dirección mediante la pérdida de un protón del α-carbono de la molécula de prolina. Como resultado, la estructura del estado de transición contiene un carbanión con carga negativa, en el que los tres enlaces formados por el átomo de carbono están todos en el mismo plano.

De forma contraria a la diferencia de la energía libre estándar para una reacción, la energía de activación requerida para alcanzar el estado de transición no es un valor fijo, sino que varía con el mecanismo de reacción particular utilizado. Las enzimas catalizan reacciones al disminuir la magnitud de la barrera de energía de activación. En consecuencia, a diferencia de la catálisis por el calor, las enzimas hacen que sus sustratos sean muy reactivos sin tener que elevarlos a niveles de energía particularmente altos. En la figura 3-9 se muestra una comparación entre el porcentaje de moléculas capaces de reaccionar en una reacción catalizada por enzimas, frente a una reacción no catalizada. Las enzimas son capaces de reducir las energías de activación uniéndose más firmemente al estado de transición que a los reaccionantes, lo que estabiliza este complejo activado disminuyendo así su energía. Como resultado, las diferencias en la geometría y las propiedades de unión entre los reaccionantes y el estado de transición son un foco de investigación en los mecanismos enzimáticos. La importancia del estado de transición se puede demostrar de muchas maneras. Por ejemplo:

- Los compuestos que se asemejan al estado de transición de una reacción tienden a ser inhibidores muy efectivos de esa reacción, porque son capaces de unirse muy estrechamente a la región catalítica de la enzima.
- Los anticuerpos normalmente no se comportan como enzimas, sino que simplemente se unen a las moléculas con gran afinidad. Sin embargo, los anticuerpos que se unen a un compuesto que se asemeja a un estado de transición para una reacción a menudo pueden actuar como enzimas, y catalizar la descomposición de ese compuesto.

A medida que el estado de transición se convierte en productos, la afinidad de la enzima por la(s) molécula(s) unida(s) disminuye, y los productos son expulsados.

## El sitio activo

Como catalizadores, las enzimas aceleran los procesos de ruptura y formación de enlaces. Para lograr esta tarea, las enzimas se involucran íntimamente en las actividades que tienen lugar entre los reaccionantes. Las enzimas hacen esto formando un complejo con los reaccionantes, llamado **complejo enzima-sustrato (ES, *enzyme-substrate*)**. En la **FIGURA 3-10** se muestra un esquema de complejo ES. En la mayoría de los casos, la asociación entre la enzima y el sustrato es no covalente, aunque se conocen muchos ejemplos en los que se forma un enlace covalente transitorio.

Aquella parte de la molécula de la enzima que está directamente involucrada en la unión del sustrato se denomina **sitio activo**. El sitio activo y el (los) sustrato(s) tienen formas complementarias, lo que les permite unirse con un alto grado de precisión. La unión del sustrato a la enzima se realiza mediante los mismos tipos de interacciones no covalentes (enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas) que determinan la estructura de la proteína misma. Por ejemplo, la enzima representada en la **FIGURA 3-11*a*)** contiene varios residuos cargados positivamente, ubicados de forma estratégica para unir átomos de sustrato cargados negativamente. Además de unirse al sustrato, el sitio activo contiene una matriz particular de cadenas laterales de aminoácidos, que influye en el sustrato y disminuye la energía de activación de la reacción. La importancia de las cadenas laterales individuales del sitio activo se puede evaluar mediante mutagénesis dirigida al sitio (consúltese sección 18.25), una técnica en la que un aminoácido particular es reemplazado por otro aminoácido que tiene propiedades diferentes.

El sitio activo normalmente está enterrado en una hendidura o grieta que conduce desde el entorno acuoso a las profundidades de la proteína. Cuando un sustrato ingresa en la hendidura del sitio activo, por lo general abandona sus moléculas de agua ligada (desolvatación) y entra en un entorno hidrofóbico dentro de la enzima. La reactividad de las cadenas laterales del sitio ac-

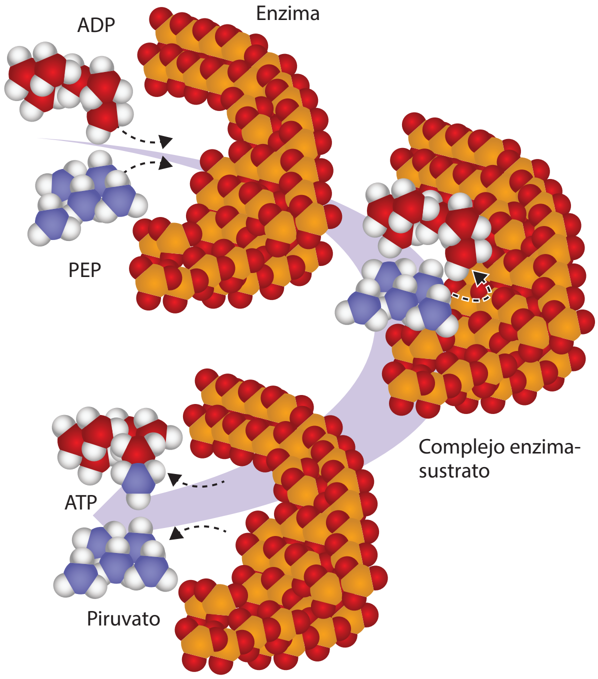



**FIGURA 3-10 Formación de un complejo enzima-sustrato**. Dibujo esquemático de la reacción catalizada por la piruvato cinasa (véase figura 3-24) en la que los dos sustratos, fosfoenolpiruvato (PEP, *phosphoenolpyruvate*) y ADP, se unen a la enzima para formar un complejo enzima-sustrato (ES), que conduce a la formación de los productos piruvato y ATP.

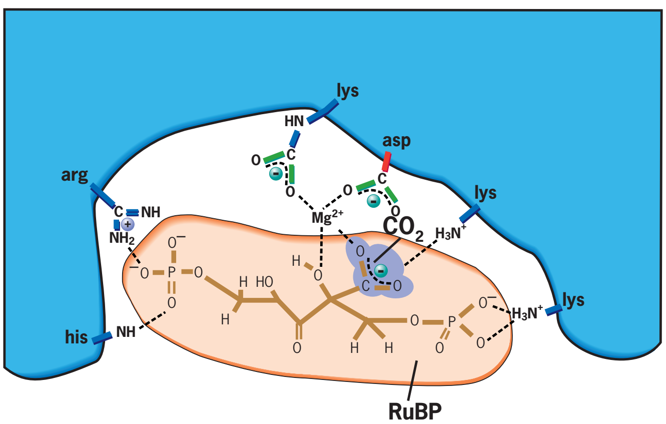
tivo puede ser mucho mayor en este entorno protegido en comparación con el disolvente acuoso de la célula. Los aminoácidos que componen el sitio activo normalmente están situados en puntos distantes a lo largo de la cadena polipeptídica extendida, pero se acercan entre sí a medida que el polipéptido se pliega en su estructura terciaria final (consúltese figura 3-11*b*). La estructura del sitio activo no solo explica la actividad catalítica de la enzima, sino también su especificidad. Como se indicó anteriormente, la mayoría de las enzimas son capaces de unir solo una molécula biológica, o un pequeño número de ellas estrechamente relacionadas.

**REPASO**

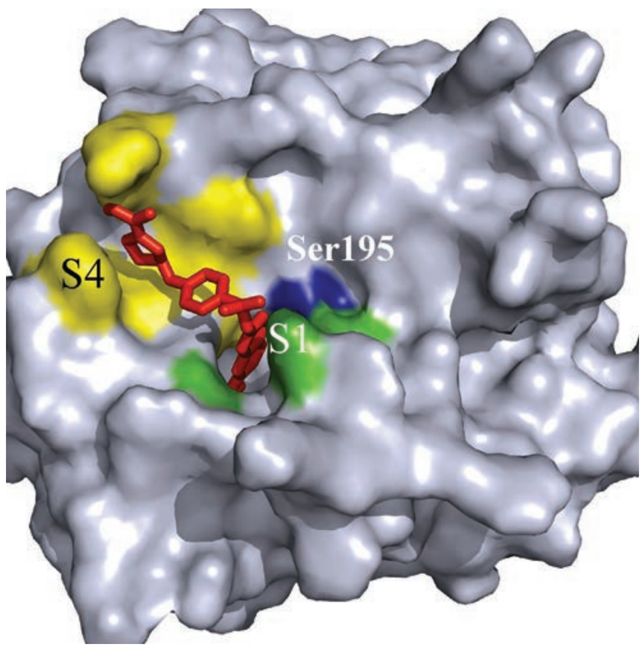
1. ¿Cómo es posible tener una reacción caracterizada por un $\Delta G$ grande y una $E_A$ pequeña? ¿Una gran $E_A$ y un pequeño $\Delta G$?
2. Explique cómo las enzimas pueden ser tan específicas hacia los sustratos a los que se unen.

## 3.6 Mecanismos de la catálisis de enzimas

¿Cómo es que una enzima puede causar que una reacción ocurra cientos de veces por segundo cuando la misma reacción puede ocurrir a tasas indetectables en ausencia de la enzima? La respuesta radica en la formación del complejo enzima-sustrato, que permite que el (los) sustrato(s) se extraiga(n) de la disolución y se mantenga(n) en la superficie de la gran molécula del catalizador. Una vez allí, las propiedades físicas y químicas del sustrato se pueden ver afectadas de varias maneras, algunas de las cuales se describen en las siguientes secciones.




*a*)




*b*)

**FIGURA 3-11 Sitio activo de una enzima**. *a*) Diagrama del sitio activo de la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa que muestra los diversos sitios de interacción entre los sustratos unidos (RuBP y $CO_2$) y ciertas cadenas laterales de aminoácidos de la enzima. Además de determinar las propiedades de unión al sustrato del sitio activo, estas interacciones no covalentes alteran las propiedades del sustrato de manera que aceleran su conversión a productos. *b*) Mapa de densidad electrónica del sitio activo de una enzima de coagulación de la sangre llamada factor Xa con un inhibidor químico que imita el sustrato, la protrombina, que se muestra superpuesta (roja). La superficie gris proporciona una indicación de los alcances externos de los orbitales de electrones de los átomos que forman las cadenas laterales de la enzima, plasmando así una representación visual del espacio ocupado por los átomos del sitio activo. Se puede ver claramente que el sustrato se une a una hendidura profunda en la proteína, típica de los sitios activos. El sitio activo serina, Ser195, aparece en azul. Las regiones de proteínas importantes para determinar qué moléculas se pueden unir como sustratos, conocidas como S1 y S4, están formadas por múltiples cadenas laterales y están indicadas en amarillo y verde.

FUENTE: *a*) D. A. Harris. *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell; 1995, p. 88; *b*) de Yeh C. H., Fredenburgh J. C., Weitz J. I. Oral direct factor Xa inhibitors. *Circulation Research* 2012;111,1069-1078.

## Orientación del sustrato

Suponga que usted coloca un puñado de tuercas y tornillos cortos en una bolsa y agita la bolsa durante cinco minutos. Es muy poco probable que alguno de los tornillos tenga una tuerca firmemente unida a su extremo cuando haya terminado. Por el contrario, si tomara un tornillo con una mano y una tuerca con la otra, podría rápidamente guiar el tornillo hacia la tuerca. Al mantener la tuerca y el tornillo en la orientación correcta, habrá disminuido en gran medida la entropía del sistema. Las enzimas reducen la entropía de sus sustratos de una manera similar.

Los sustratos unidos a la superficie de una enzima se juntan exactamente en la orientación correcta para realizar la reacción (consúltese **FIGURA 3-12*a***). En contraste, cuando los reaccionantes están presentes en la solución, son libres de experimentar movimientos de traslación y rotación, e incluso aquellos que poseen suficiente energía no necesariamente experimentan una colisión que resulta en la formación de un complejo de estado de transición.

## El cambio de la reactividad del sustrato

Las enzimas se componen de aminoácidos que tienen una variedad de diferentes tipos de cadenas laterales, desde completamente cargadas hasta altamente no polares. Cuando un sustrato se une a la superficie de una enzima, la distribución de electrones dentro de esa molécula de sustrato está influenciada por las cadenas laterales vecinas de la enzima (véase figura 3-12*b*). Esta influencia aumenta la reactividad del sustrato y estabiliza el complejo de estado de transición formado durante la reacción. Estos efectos se logran sin la entrada de energía externa, como el calor.

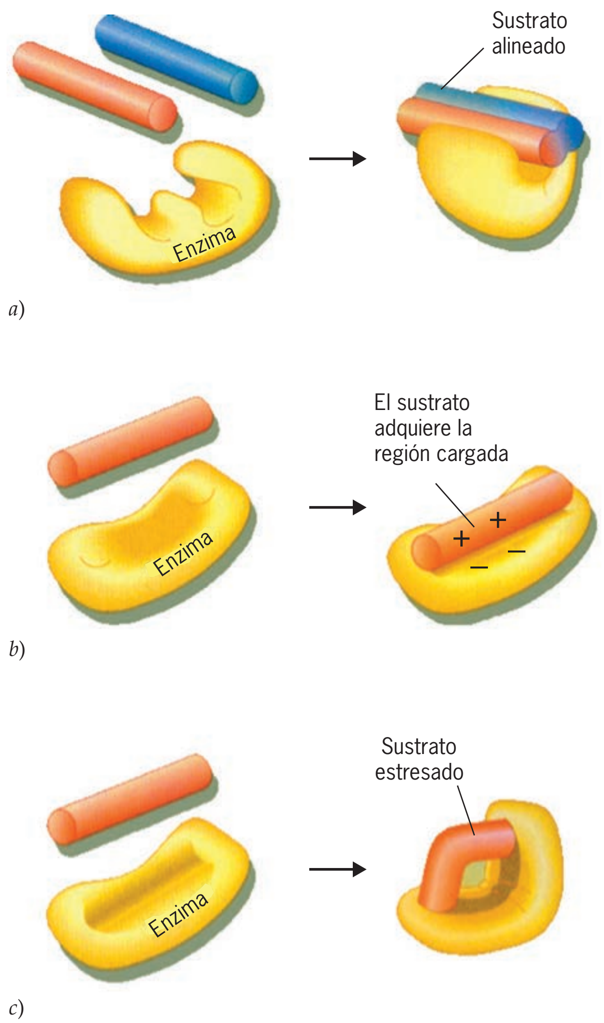



**FIGURA 3-12 Tres mecanismos mediante los cuales las enzimas aceleran las reacciones**: *a*) manteniendo una orientación precisa del sustrato, *b*) cambiando la reactividad del sustrato al alterar su configuración electrostática, c) ejerciendo un estrés físico sobre los enlaces en el sustrato que se va a romper.

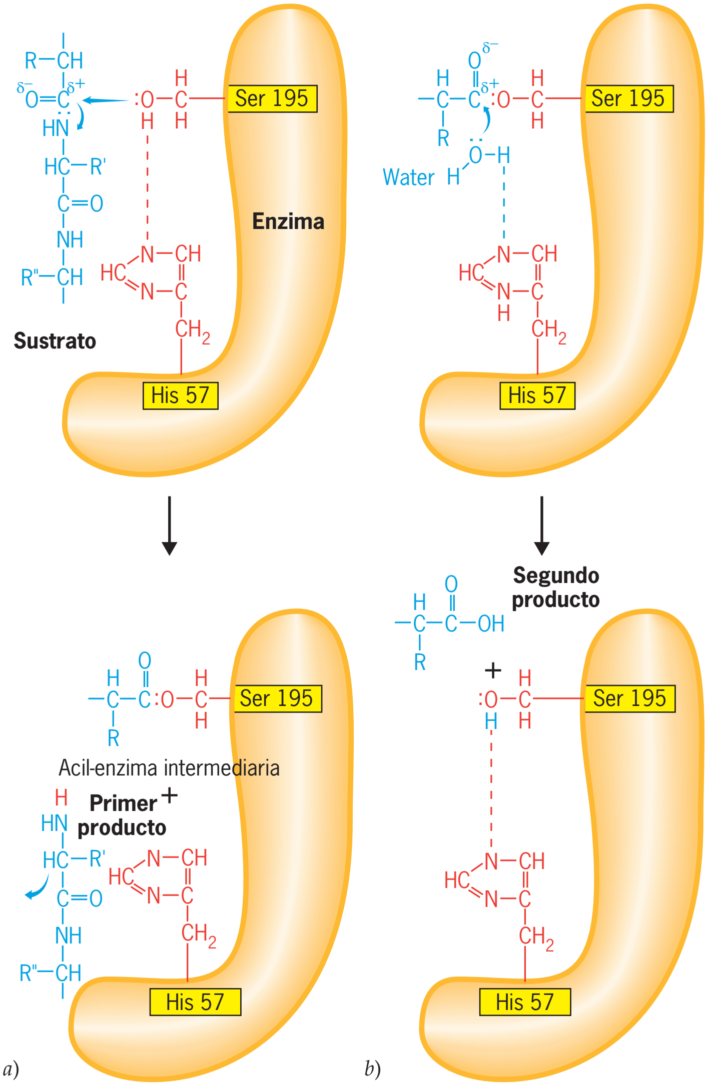
Existen varios mecanismos generales por los cuales la reactividad de los sustratos aumenta por la asociación con enzimas. Básicamente, estos mecanismos son similares a los caracterizados por los químicos orgánicos que estudian los mecanismos de las reacciones orgánicas en un tubo de ensayo. Por ejemplo, la velocidad de las reacciones puede verse muy afectada por los cambios en el pH. Aunque las enzimas no pueden cambiar el pH de su medio, sí contienen numerosos aminoácidos con cadenas laterales ácidas o básicas. Estos grupos son capaces de donar o aceptar protones hacia y desde el sustrato, alterando así el carácter electrostático del sustrato, haciéndolo más reactivo.

Los sitios activos de muchas enzimas contienen cadenas laterales con una carga parcial positiva o negativa. Dichos grupos son capaces de interactuar con un sustrato para alterar sus propiedades electrostáticas (véase figura 3-12*b*), y por tanto su reactividad. Dichos grupos también son capaces de reaccionar con un sustrato para producir un enlace covalente enzima-sustrato temporal. La quimotripsina, una enzima que digiere las proteínas de los alimentos dentro del intestino delgado, actúa de esta manera. La serie de reacciones que tienen lugar cuando la quimotripsina hidroliza un enlace peptídico en una proteína sustrato se muestra en la **FIGURA 3-13**. En dicha figura la reacción está dividida en dos pasos. En el primer paso, el átomo de oxígeno electronegativo de la cadena lateral de una serina de la enzima “ataca” a un átomo de carbono del sustrato. Como resultado, el enlace peptídico del sustrato se hidroliza y se forma un enlace covalente entre la serina y el sustrato, desplazando el resto del sustrato como uno de los productos. Como se plantea en la leyenda de la figura, la capacidad de la serina para llevar a cabo esta reacción depende de un residuo de histidina cercano, que atrae al protón del grupo hidroxilo de la serina, lo cual aumenta el poder nucleofílico del átomo de oxígeno del grupo. Las enzimas también son expertas en utilizar moléculas de agua en las reacciones que catalizan. En el segundo paso que se muestra en la figura 3-13*b*), el enlace covalente entre la enzima y el sustrato se escinde mediante una molécula de agua, la enzima vuelve a su estado original sin unión, y se libera el resto del sustrato como segundo producto.

Aunque las cadenas laterales de aminoácidos pueden participar en una variedad de reacciones, no son adecuadas para donar o aceptar electrones. Como veremos en la siguiente sección (y con más profundidad en los capítulos 5 y 6), la transferencia de electrones es el desempeñan central en las reacciones de oxidación-reducción que desempeñan un papel tan vital en el metabolismo celular. Para catalizar estas reacciones, las enzimas contienen cofactores (iones metálicos o coenzimas) que aumentan la reactividad de los sustratos al eliminar o donar electrones. En varios casos, las enzimas crean su propio cofactor aceptor de electrones al modificar químicamente uno de los residuos de aminoácidos situados en su sitio activo.

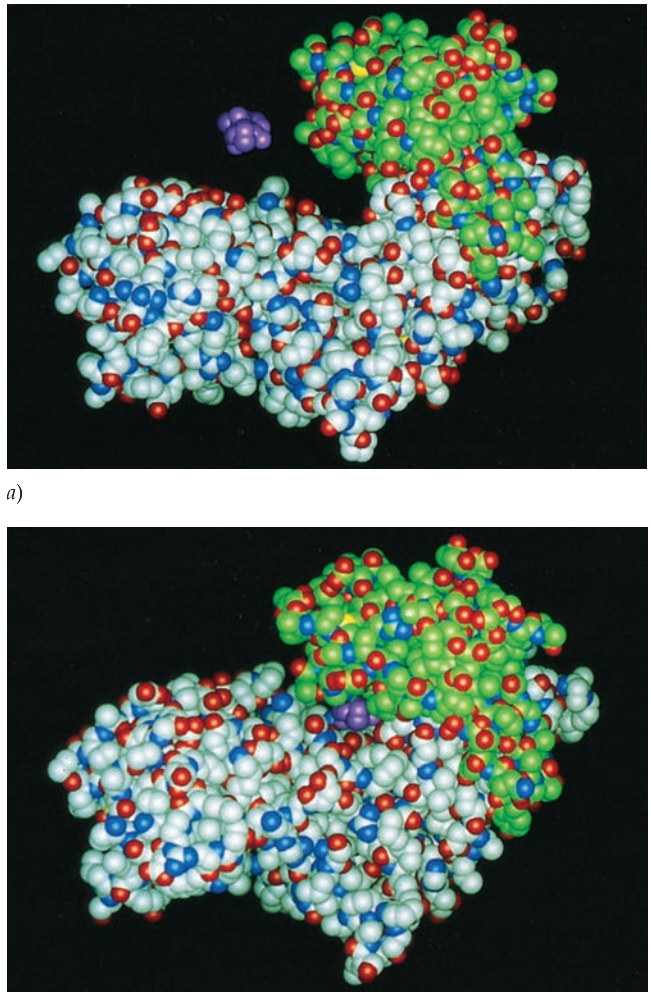
## La inducción de tensión en el sustrato

Aunque el sitio activo de una enzima puede ser complementario a su(s) sustrato(s), varios estudios revelan un cambio en las posiciones relativas de ciertos átomos de la enzima una vez que el sustrato se ha unido. En muchos casos, la conformación cambia de modo que se mejora el ajuste complementario entre la enzima y los reaccionantes (un **ajuste inducido**), y los grupos reaccionantes apropiados de la enzima se mueven en su lugar. Un ejemplo de ajuste inducido se muestra en la **FIGURA 3-14**. Estos tipos de movimientos dentro de una molécula de enzima proporcionan




a) b)

**FIGURA 3-13 Diagrama del mecanismo catalítico de la quimotripsina.** La reacción se divide en dos pasos. *a*) El átomo de oxígeno electronegativo de un residuo de serina (Ser195) en la enzima, que lleva una carga negativa parcial, lleva a cabo un ataque nucleófilo en el átomo de carbono carbonilo del sustrato, que lleva una carga positiva parcial, lo que divide el enlace péptido. El sustrato polipeptídico se muestra en azul. La serina se vuelve más reactiva mediante un residuo de histidina aplicado de cerca (His57) que extrae el protón de la serina y posteriormente dona el protón al átomo de nitrógeno del enlace peptídico escindido. La histidina puede hacer esto porque su cadena lateral es una base débil que es capaz de ganar y perder un protón a un pH fisiológico. (Una base más fuerte como la lisina permanecería totalmente protonada a este pH). Parte del sustrato forma un enlace covalente transitorio con la enzima por medio de la cadena lateral de serina, mientras que el resto del sustrato se libera como el primer producto. (Se puede observar que los residuos de serina e histidina están situados a 138 aminoácidos uno del otro en la secuencia primaria, pero se juntan dentro de la enzima mediante el plegamiento del polipéptido. Un ácido aspártico, el residuo 102 que no se muestra, también desempeña un papel en la catálisis, influyendo en el estado iónico de la histidina). *b*) En el segundo paso, el átomo de oxígeno electronegativo de una molécula de agua desplaza al sustrato unido en forma covalente de la enzima, y regenera la molécula de enzima no unida. Como en el primer paso, la histidina realiza un papel en la transferencia de protones; en este paso, el protón se elimina del agua, por lo que es un nucleófilo mucho más fuerte. El protón se dona posteriormente al residuo de serina de la enzima.



a) b)

**FIGURA 3-14 Un ejemplo de ajuste inducido**. Cuando una molécula de glucosa se une a la enzima hexoquinasa, la proteína sufre un cambio conformacional que encierra el sustrato dentro de la bolsa del sitio activo y alinea los grupos reaccionantes de la enzima y el sustrato.

FUENTE: Cortesía de Thomas A. Steitz, Universidad de Yale.

un buen ejemplo de una proteína que actúa como una máquina molecular. A medida que ocurren estos cambios conformacionales, se realiza trabajo mecánico, lo que permite que la enzima ejerza una fuerza física sobre ciertos enlaces dentro de una molécula de sustrato. Esto tiene el efecto de desestabilizar el sustrato, haciendo que adopte el estado de transición en el que se alivia la tensión (véase figura 3-12*c*).

Para comprender completamente el mecanismo por el cual una enzima cataliza a una reacción particular, es necesario describir los diversos cambios en la estructura atómica y electrónica, tanto en la enzima como en el (los) sustrato(s) a medida que avanza la reacción. Vimos en el último capítulo cómo las técnicas de cristalografía de rayos X pueden revelar detalles de la estructura de una gran molécula de enzima. Debido a que de 40 a 60% del volumen de un cristal de proteína típico consiste en solvente atrapado, la mayoría de las enzimas cristalizadas retienen un alto nivel de actividad enzimática. Por tanto, debería ser posible usar técnicas de difracción de rayos X para estudiar los mecanismos de reacción. Hay una limitación importante; a saber, el tiempo. En un estudio de cristalografía estándar, los cristales de enzima deben someterse a un haz de rayos X durante un periodo de horas o días mientras se recopilan los datos necesarios (consúltese **el video experimental de Walkthrough: cristalografía de rayos X para este capítulo**). El retrato que surge de tales estudios capta la estructura de la molécula promediada a lo largo del tiempo. Sin embargo, recientes innovaciones han hecho posible usar técnicas de cristalografía de rayos X para observar los cambios estructurales fuga-

ces que tienen lugar en el sitio activo, mientras que una enzima está catalizando un único ciclo de reacción. Este enfoque, que se llama *cristalografía de resolución temporal*, puede incluir:

- El uso de rayos X de ultraalta intensidad generados por un sincrotrón, un instrumento utilizado por los físicos nucleares para estudiar partículas subatómicas. Esto puede reducir el periodo de exposición a rayos X en el orden de los picosegundos, que es la misma escala de tiempo requerida para que una enzima catalice una única transformación química.
- Enfriamiento de los cristales de la enzima a temperaturas entre 20 y 40 grados Kelvin, lo que ralentiza la reacción en un factor de hasta 10 mil millones y aumenta considerablemente la vida útil de los intermedios transitorios.
- Uso de técnicas para desencadenar simultáneamente una reacción a través de un cristal completo, para que todas las moléculas de la enzima en el cristal estén en la misma etapa de la reacción al mismo tiempo. Por ejemplo, en el caso de una reacción en la que el ATP es un sustrato, los cristales de la enzima pueden infiltrarse con moléculas de ATP que se han vuelto no reactivas uniéndolas a un grupo inerte (p. ej., un grupo nitrofenilo) mediante un enlace fotosensible. Cuando los cristales se exponen a un breve pulso de luz, todas las moléculas de ATP "enjauladas" se liberan e inician la reacción simultáneamente en sitios activos a través del cristal.
- Uso de enzimas que albergan mutaciones dirigidas al sitio (sección 18.25) que imponen barreras cinéticas en etapas específicas de la reacción, lo que lleva a un aumento de la vida útil de intermediarios particulares.
- Determinación de la estructura a una resolución ultraalta (atómica) (p. ej., 0.8 Å), que permite la visualización de hidrógenos individuales que pueden estar presentes en enlaces de hidrógeno, o asociados con grupos ácidos en la proteína; la presencia o ausencia de moléculas de agua ligadas; la conformación precisa de las cadenas laterales catalíticas, y la tensión sutil que aparece en partes del sustrato durante la catálisis. El notable detalle que se puede extraer de estas imágenes de alta resolución se ilustra mediante el enlace de hidrógeno en la **FIGURA 3-15**.

Con la combinación de estas técnicas, los investigadores han podido determinar la estructura tridimensional de una enzima en etapas sucesivas durante una sola reacción catalizada. Cuando estas "instantáneas" individuales se combinan en secuencia, producen una "película" que muestra los diversos productos intermedios catalíticos, que aparecen y desaparecen a medida que avanza la reacción. En la **FIGURA 3-16** se muestra un ejemplo de los datos que se pueden recopilar utilizando varios de estos enfoques.

Si bien la atención se centró en los cambios conformacionales que ocurren cuando una enzima transforma sus sustratos en productos, en los últimos años también se ha prestado considerable atención a los cambios conformacionales que ocurren dentro de la proteína misma. Como se muestra en la figura 2-39, las proteínas son moléculas dinámicas capaces de un movimiento incorporado (intrínseco) que puede tener una importante relevancia funcional. En el caso representado en la figura 2-39, este movimiento permite la entrada de sustrato al sitio activo de la enzima. El análisis de este tipo de movimiento intrínseco mediante diversas técnicas experimentales ha sugerido que las proteínas, incluso en ausencia de sustrato, son capaces de muchos de los mismos movimientos que se pueden detectar durante el ciclo catalítico de la proteína. De ser cierto, esto sugiere que la evolución ha seleccionado estructuras de proteínas capaces de movimientos intrínsecos que pueden ser útiles para las funciones potenciales en las que podría servir una proteína. Más que inducir un cambio conformacional específico, el (los) sustrato(s) podría(n) estar simplemente "esperando" que una proteína asuma una conformación a la cual se pueda unir de manera efectiva.

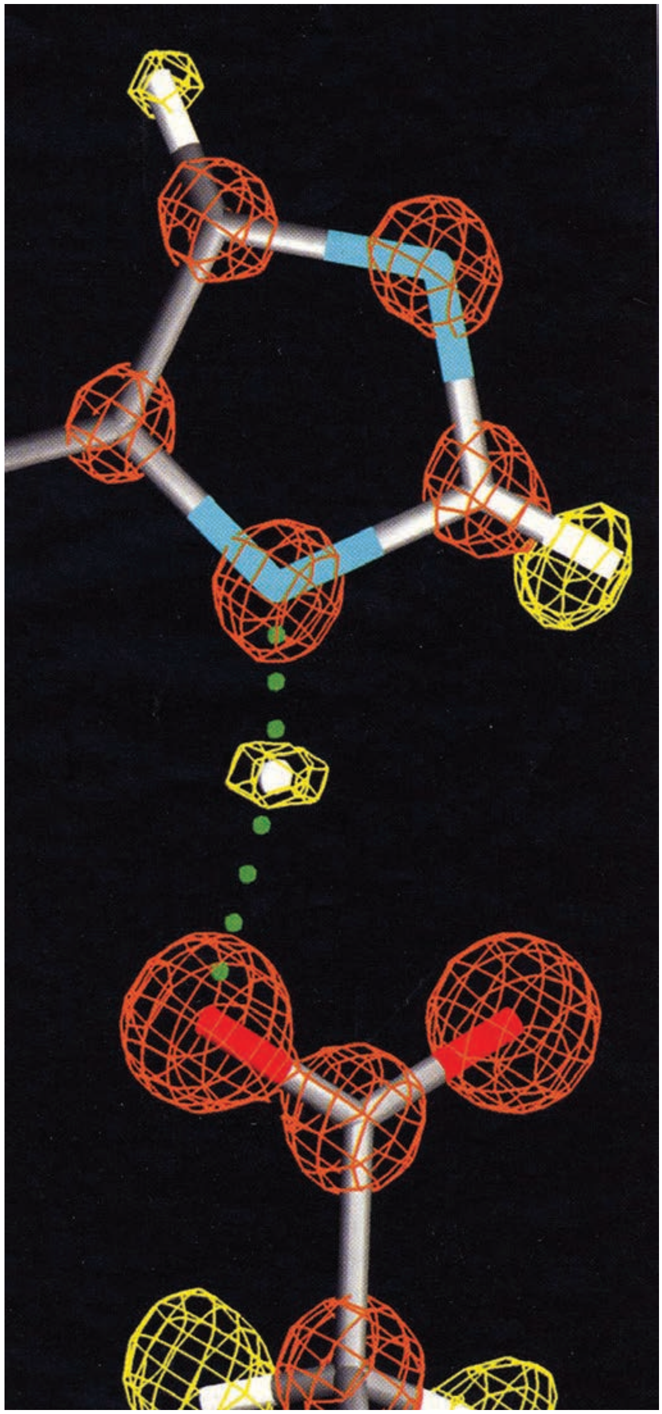


**FIGURA 3-15 Mapa de densidad electrónica de un enlace simple de hidrógeno** (línea de puntos verdes). Este mapa muestra una pequeña parte de la enzima proteolítica subtilisina a una resolución atómica (0.78 Å). Se ve que el átomo de hidrógeno (amarillo) se comparte entre un átomo de nitrógeno, en el anillo de un residuo de histidina, y un átomo de oxígeno de un residuo de ácido aspártico.
FUENTE: De Peter Kuhn, *et al. Biochemistry* 1998;37:13450, cortesía de Richard Bott; © 1998 American Chemical Society.

## REPASO

1. Examine la figura 3-13 que ilustra los pasos en una reacción catalizada enzimáticamente y describa lo que está ocurriendo sin leer la leyenda.

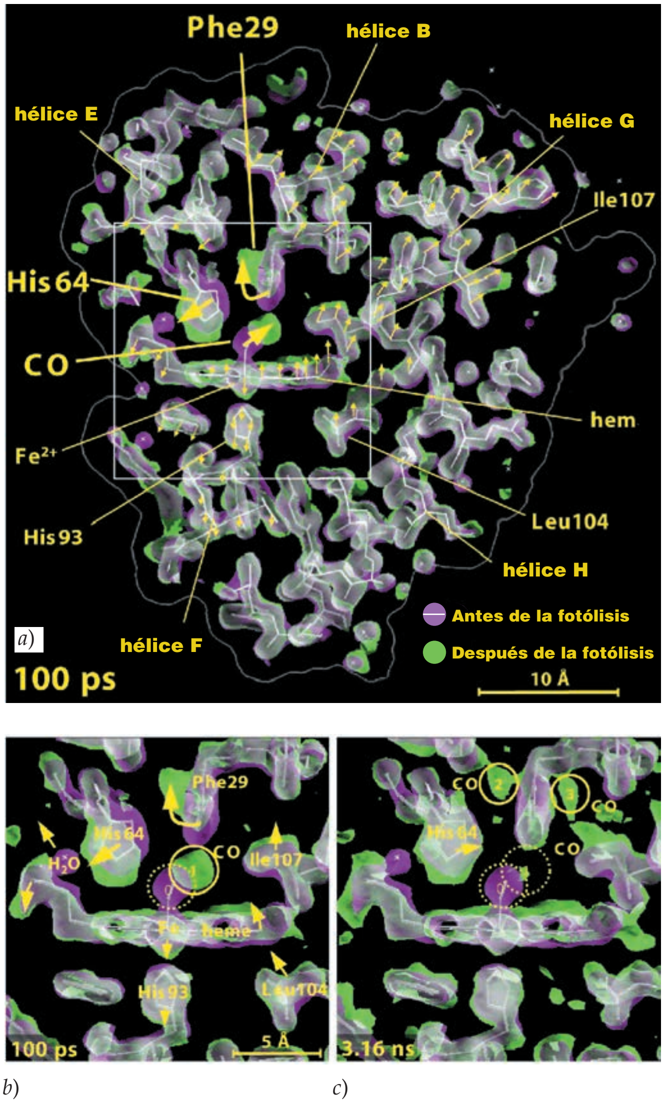



**FIGURA 3-16 Mioglobina: la película.** En este ejemplo de cristalografía de rayos X de resolución temporal, la estructura de la mioglobina (Mb) se determinó con una molécula de CO unida al grupo hem y en varios instantes después de liberar la molécula de CO. (El CO se une al mismo sitio en Mb como el $O_2$, pero es más adecuado para este tipo de estudios). La liberación de CO se indujo simultáneamente a través del cristal por exposición a un destello de luz láser (fotólisis). Cada una de las estructuras se determinó siguiendo un solo pulso de rayos X intenso de un sincrotrón. La molécula de mioglobina que se estaba estudiando tenía una única sustitución de aminoácidos que la convertía en un mejor sujeto para el análisis. *a*) Corte de 6.5 Å de espesor a través de una molécula Mb que muestra los cambios que ocurren en 100 picosegundos (1 ps = 1 billonésima de segundo) después de la liberación del CO de su sitio de unión. La estructura de Mb antes del flash láser se muestra en magenta, y la estructura de la proteína 100 ps después del flash láser se muestra en verde. Aquellas partes de la molécula que no cambiaron de estructura durante este periodo aparecen en blanco. Se pueden ver tres desplazamientos a gran escala cerca del sitio de unión del CO (indicado por las flechas amarillas). Una vista ampliada de la región enmarcada en la parte *a*). El CO liberado (círculo sólido) está situado a unos 2 Å de su sitio de unión original (círculo discontinuo). El movimiento del CO se acomoda por la rotación de Phe29, que empuja la His64 hacia afuera, que a su vez desaloja una molécula de agua ligada. *c*) En 3.16 nanosegundos después del destello láser, la molécula de CO ha migrado a cualquiera de las dos posiciones mostradas (etiquetadas 2 y 3), las Phe29 e His64 se han relajado hacia sus estados iniciales, y el grupo hem ha sufrido un desplazamiento considerable como se indica por la mayor cantidad de sombreado verde en la región del hem.
FUENTE: Reproducida con permiso de Friedrich Schotte, *et al. Science* 2003; 300:1946; Copyright © 2003, reimpreso con permiso de AAAS.

## 3.7 Cinética de enzimas

Las enzimas varían mucho en su capacidad para catalizar reacciones. La actividad catalítica de una enzima se revela mediante el estudio de su cinética, es decir, la velocidad a la que cataliza una reacción en diversas condiciones experimentales.

### El modelo Michaelis-Menten de la cinética de enzimas

En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten informaron sobre la relación matemática entre la concentración del sustrato y la velocidad de las reacciones enzimáticas, medida por la velocidad de formación de productos (también conocida como velocidad de reacción). Esta relación se puede expresar mediante una ecuación (dada en la página 98) que genera una hipérbola, como se muestra en la **FIGURA 3-17**. Para determinar la velocidad de una reacción experimentalmente, se establece una mezcla de incubación a la temperatura deseada, que contiene todos los ingredientes que se requieren, excepto uno que inicia la reacción cuando se agrega. Si en el momento en que comienza la reacción, no hay productos presentes en la mezcla, la cantidad de producto que aparece con el tiempo proporciona una medida de la velocidad de la reacción. Hay factores que complican este procedimiento. Si el tiempo de incubación es demasiado grande, la concentración de sustrato se reduce de forma mensurable. Además, a medida que aparece el producto puede reconvertirse al sustrato mediante la reacción inversa, que también es catalizada por la enzima. Idealmente, lo que queremos determinar es la velocidad *inicial*, es decir, la velocidad en el instante en que aún no se ha formado ningún producto. Para medir con precisión la velocidad de reacción inicial, se emplean breves tiempos de incubación y técnicas de medición sensibles.

Para generar una curva como la que se muestra en la figura 3-17, la velocidad inicial se determina para una serie de mezclas de incubación que contienen la misma cantidad de enzima, pero un aumento de la concentración de sustrato. Es evidente a partir de esta curva que la velocidad de reacción inicial varía marcada-

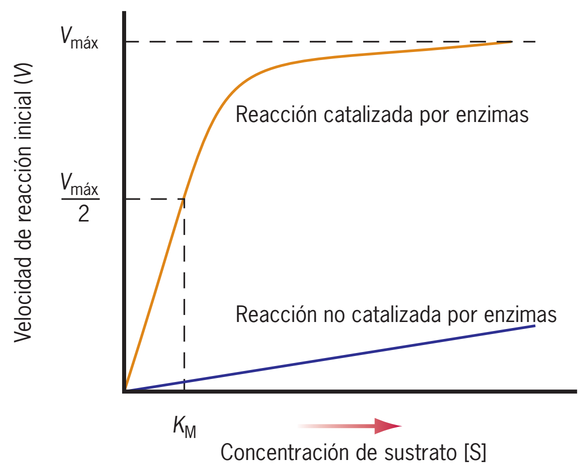



**FIGURA 3-17 Relación entre la velocidad de una reacción catalizada por enzima y la concentración del sustrato**. Dado que cada molécula de enzima solo puede catalizar un cierto número de reacciones en una cantidad de tiempo dada, la velocidad de la reacción (típicamente expresada como moles de producto formados por segundo) se aproxima a una velocidad máxima a medida que aumenta la concentración de sustrato. La concentración de sustrato a la que la reacción se encuentra a la mitad de la velocidad máxima ($V_{máx}/2$) se denomina constante de Michaelis o $K_M$.

mente con la concentración de sustrato. A bajas concentraciones de sustrato, las moléculas de enzima se someten a relativamente pocas colisiones con el sustrato en una cantidad de tiempo dada. En consecuencia, la enzima tiene "tiempo inactivo"; es decir, las moléculas de sustrato tienen un límite de velocidad. A altas concentraciones de sustrato, las enzimas colisionan con las moléculas de este más rápidamente de lo que pueden convertirse en producto. Por tanto, a altas concentraciones de sustrato, las moléculas de enzima individuales están trabajando a su capacidad máxima; es decir, las moléculas de enzima son limitantes de velocidad. Así, a medida que una concentración mayor y mayor de sustrato está presente en la mezcla de reacción, la enzima se aproxima a un estado de *saturación*. La velocidad inicial en este punto de saturación teórica se denomina **velocidad máxima ($V_{máx}$)**.

La medida más simple de la actividad catalítica de una enzima viene dada por su **número de recambio**, que se puede calcular a partir de la $V_{máx}$. El número de recambio (o *constante catalítica*, $k_{cat}$, como también se le llama) es la cantidad máxima de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede convertir en producto por unidad de tiempo. Un número de recambio (por segundo) de 1 a $10^3$ es típico para las enzimas, aunque se conocen valores tan grandes como $10^6$ (véase tabla 3-3). Es evidente a partir de estos valores que unas pocas moléculas de enzima pueden convertir rápidamente una gran cantidad de moléculas de sustrato en producto.

El valor de $V_{máx}$ es solo un término útil obtenido de un gráfico como el de la figura 3-17; otro es la **constante de Michaelis** ($K_M$), que es igual a la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de $V_{máx}$. Como su nombre lo indica, la $K_M$ es constante para una enzima determinada y, por tanto, es independiente de la concentración de sustrato o enzima. La relación entre $V_{máx}$ y $K_M$ se aprecia mejor al considerar la ecuación de Michaelis-Menten, que se puede usar para generar la gráfica que se muestra en la figura 3-17.

$$V = V_{máx} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

De acuerdo con la ecuación, cuando la concentración de sustrato [S] se establece en un valor equivalente a $K_M$, entonces la velocidad de la reacción ($V$) es igual a $V_{máx}/2$, o la mitad de la velocidad máxima. Por tanto, $K_M$ = [S] cuando $V = V_{máx}/2$.

Para generar una curva hiperbólica como la de la figura 3-17, y hacer una determinación precisa de los valores para $V_{máx}$ y $K_M$, se debe trazar un número considerable de puntos. Se obtiene una descripción más fácil y más precisa al trazar los recíprocos de la velocidad y la concentración de sustrato, uno contra el otro, según lo formulan Hans Lineweaver y Dean Burk. Cuando se hace esto, la hipérbola se convierte en una línea recta (véase **FIGURA 3-18**) cuya intersección en el eje $x$ es igual a $-1/K_M$, la intersección en el eje y es igual a $1/V_{máx}$, y la pendiente es igual a $K_M/V_{máx}$. Por tanto, los valores de $K_M$ y $V_{máx}$ se determinan con facilidad por extrapolación de la recta dibujada a partir de unos pocos puntos.

En la mayoría de los casos, el valor de $K_M$ proporciona una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Cuanto mayor es $K_M$, mayor es la concentración de sustrato que se requiere para alcanzar la mitad de $V_{máx}$ y, por tanto, menor es la afinidad de la enzima por ese sustrato. La $K_M$ para la mayoría de las enzimas oscila entre $10^{-1}$ y $10^{-7}$, con un valor típico de aproximadamente $10^{-4}$ M. Otros factores que influyen fuertemente en la cinética enzimática son el pH y la temperatura del medio de incubación. Cada enzima tiene un pH y temperatura óptimos, a los que opera a la máxima actividad (véase figura 3-19). La influencia de la temperatura en la actividad de la enzima se ilustra por el sorprendente efecto de la refrigeración en la desaceleración del crecimiento de microorganismos.

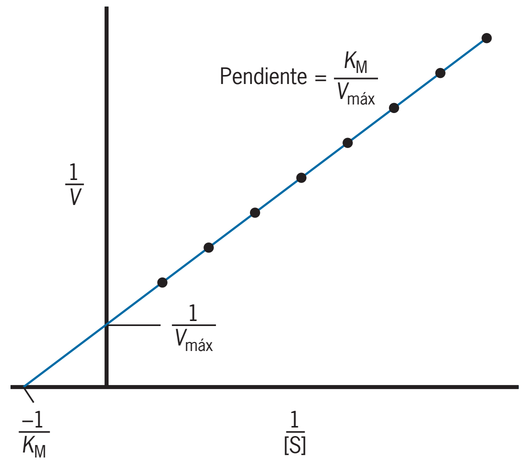



**FIGURA 3-18 Un diagrama Lineweaver-Burk** de los recíprocos de velocidad y concentración de sustrato a partir de los cuales se calculan con facilidad los valores de $V_{máx}$ y $K_M$.

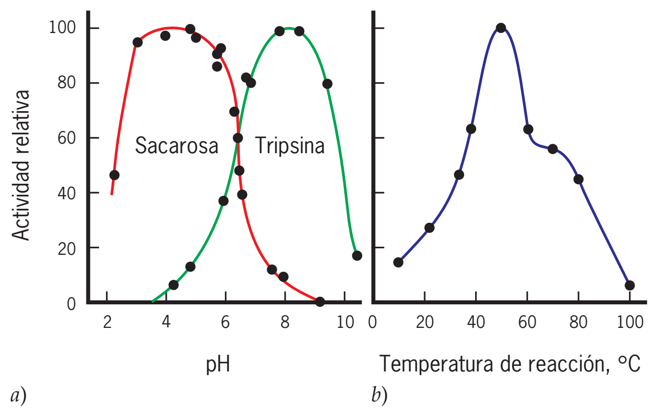



**FIGURA 3-19 Dependencia de la velocidad de una reacción catalizada por enzimas en función de *a*) el pH, y *b*) la temperatura.** La forma de las curvas y el pH y temperatura óptimos varían con la reacción particular. *a*) Los cambios en el pH afectan las propiedades iónicas del sustrato y la enzima, así como la conformación de la enzima. *b*) A temperaturas más bajas, las velocidades de reacción aumentan al incrementarse la temperatura, a causa del aumento de la energía de los reaccionantes. A temperaturas más altas, este efecto positivo se compensa con la desnaturalización enzimática.

FUENTE: *a*) De E. A. Moelwyn-Hughes. En The Enzymes, J. B. Sumner y K. Myrback (Eds.), vol. 1. Academic Press; 1950. *b*) De K. Hayashi, *et al.* *Journal Biochem* 1968 64:93, con permiso de Oxford University Press.

## Inhibidores enzimáticos

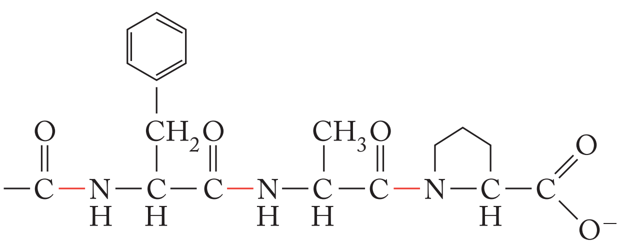
Los **inhibidores enzimáticos** son moléculas que pueden unirse a una enzima y disminuir su actividad. La célula depende de inhibidores para regular la actividad de muchas de sus enzimas; los bioquímicos usan inhibidores para estudiar las propiedades de las enzimas; muchas compañías farmacéuticas producen inhibidores enzimáticos que actúan como fármacos. Los inhibidores enzimáticos se pueden dividir en dos tipos: reversibles o irreversibles.

Los **inhibidores irreversibles** son aquellos que se unen muy fuertemente a una enzima, a menudo formando un enlace covalente a uno de sus residuos de aminoácidos. Varios gases nerviosos, como el diisopropilfosfofluoridato y los plaguicidas organofosforados, actúan como inhibidores irreversibles de la acetilcolinesterasa, una enzima que desempeña un papel crucial

en la destrucción de la acetilcolina, el neurotransmisor responsable de causar la contracción muscular. Con la enzima inhibida, el músculo se estimula continuamente y permanece en un estado de contracción permanente. Como se discute en la "Perspectiva humana" adjunta, el antibiótico penicilina actúa como un inhibidor irreversible de una enzima clave en la formación de la pared celular bacteriana.

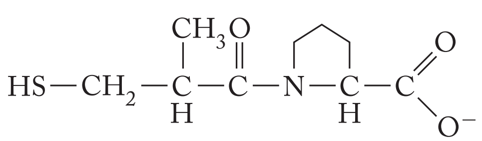
Los inhibidores reversibles, por otra parte, se unen débilmente a una enzima, y por tanto se desplazan fácilmente. En aras de la simplicidad, discutiremos los casos más simples de inhibidores reversibles; a saber, tipos competitivos y no competitivos. Los **inhibidores competitivos** son inhibidores reversibles que compiten con un sustrato para acceder al sitio activo de una enzima. Como los sustratos tienen una estructura complementaria al sitio activo al que se unen, los inhibidores competitivos se deben parecer al sustrato para competir por el mismo sitio de unión, pero ser diferentes de manera que le impidan transformarse en producto (consúltese **FIGURA 3-20**). El análisis de los tipos de moléculas que pueden competir con el sustrato por un sitio de unión en la enzima proporciona información sobre la estructura del sitio activo, y sobre la naturaleza de la interacción entre un sustrato y su enzima.

La inhibición enzimática competitiva forma la base de acción de muchos medicamentos comunes, como se ilustra en el siguiente ejemplo. La enzima convertidora de angiotensina (ACE, *angiotensin converting enzyme*) es una enzima proteolítica que actúa sobre un péptido de 10 residuos (angiotensina I) para producir un péptido de ocho residuos (angiotensina II). Los niveles elevados de angiotensina II son un factor de riesgo importante en el desarrollo de la alta presión arterial (*hipertensión*). En la década de 1960, John Vane y sus colegas de la compañía Eli Lilly comenzaron una búsqueda de compuestos que pudieran inhibir la ACE. Estudios previos habían encontrado que el veneno de una víbora brasileña contenía inhibidores enzimáticos proteolíticos, y se descubrió que uno de los componentes de este veneno, un péptido llamado teprotide.



Teprotide (enlaces peptídicos marcados en rojo)

era un potente inhibidor competitivo de la ACE. Aunque se demostró que el teprotide reduce la presión sanguínea en pacientes hipertensos, no era un fármaco muy útil porque tenía una estructura peptídica, y por tanto se degradaba rápidamente si se tomaba por vía oral. Los esfuerzos posteriores para desarrollar inhibidores no peptídicos de la enzima llevaron a los investigadores a sintetizar un compuesto llamado captopril,



Captopril

que se convirtió en el primer fármaco antihipertensivo útil que actuaba uniéndose a la ACE.

La efectividad de un inhibidor competitivo depende de su afinidad relativa por la enzima. De forma independiente, la inhibición competitiva se puede superar si la relación sustrato/inhibidor es suficientemente buena. En otras palabras, si el número de colisiones entre la enzima y el inhibidor se vuelve insignificante en relación con las que existen entre la enzima y su sustrato, entonces el efecto del inhibidor se vuelve mínimo. Dada una suficiente concentración de sustrato, sigue siendo teóricamente posible alcanzar la velocidad máxima de la enzima, incluso en presencia del inhibidor competitivo. Debido a que muchos medicamentos utilizados para tratar la enfermedad humana actúan inhibiendo las enzimas, es extremadamente importante poder desarrollar compuestos que tengan una afinidad bastante alta por la enzima como para que puedan competir de manera efectiva con el sustrato natural. El proceso por el cual se desarrollan tales compuestos de unión fuerte se ilustra en el capítulo 2, en el contexto del inhibidor de BCR-ABL Gleevec (consúltese figura 2-51).

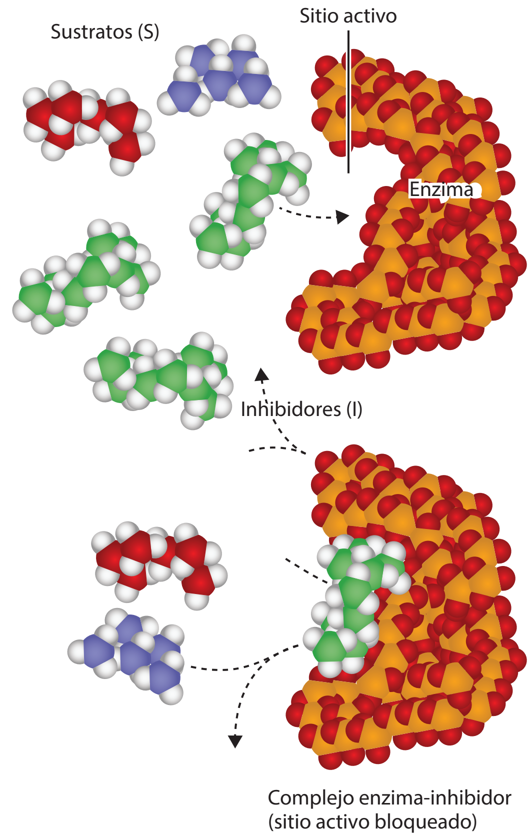



**FIGURA 3-20 Inhibición competitiva**. Debido a su similitud molecular, los inhibidores competitivos pueden competir con el sustrato por un sitio de unión en la enzima. El efecto de un inhibidor competitivo depende de las concentraciones relativas del inhibidor y el sustrato.

En la **inhibición no competitiva**, el sustrato y el inhibidor no compiten por el mismo sitio de unión; por lo general el inhibidor actúa en un sitio que no es el sitio activo de la enzima. El nivel de inhibición depende solo de la concentración del inhibidor, y el aumento de la concentración del sustrato no puede superarlo. Esto se debe a que, en presencia de un inhibidor no competitivo, una cierta fracción de las moléculas de la enzima están necesariamente inactivas en un instante dado, y no se puede alcanzar la velocidad máxima de la población de moléculas de la enzima. El tipranavir es un potente inhibidor no competitivo de la proteína producida por el VIH cuando infecta un glóbulo blanco. A diferencia de otros inhibidores de esta enzima, como el ritonavir, el tipranavir no se parece al sustrato peptídico de la enzima, ni tampoco compite con el sustrato. Los efectos sobre la cinética de las enzimas en presencia de inhibidores competitivos y no competitivos se muestran en la **FIGURA 3-21**. En un caso, la $V_{máx}$ se reduce, y en el otro, la $K_M$ aumenta. En ambos tipos la pendiente ($K_M/V_{máx}$) se incrementa en relación con la reacción desinhibida.

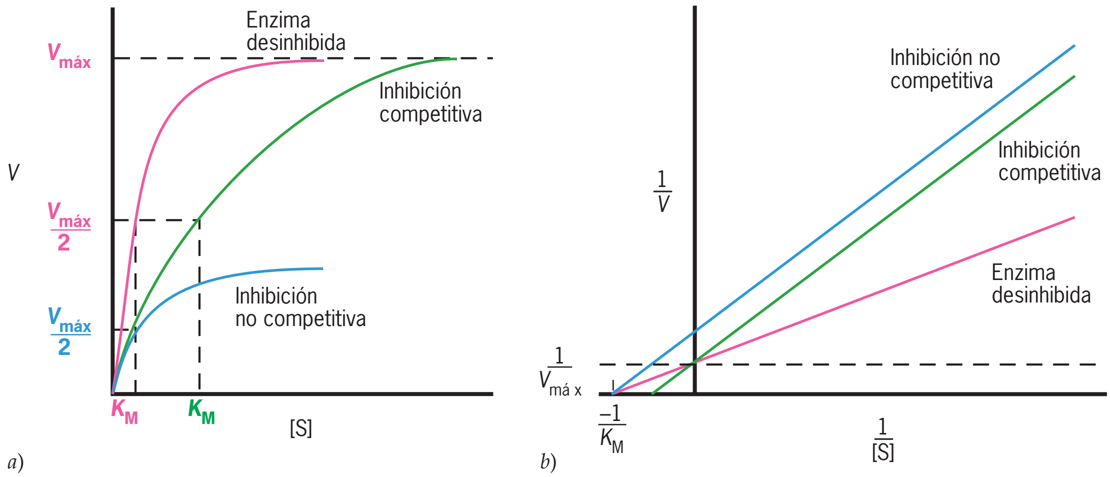



**FIGURA 3-21 Efectos de los inhibidores en la cinética de la enzima.** El efecto de los inhibidores, tanto competitivos como no competitivos, se muestra cuando la cinética de la reacción se representa gráficamente como la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato *a*) o su recíproco *b*). El inhibidor no competitivo reduce la $V_{máx}$ sin afectar $K_M$, mientras que el inhibidor competitivo aumenta $K_M$ sin afectar la $V_{máx}$.

Como se verá en la página 110, las células utilizan una versión de inhibición no competitiva para regular la actividad de las enzimas clave de las secuencias metabólicas.

**REPASO**

1. Haga una distinción entre $K_M$ y $V_{máx}$.

# 3.8 PERSPECTIVA HUMANA

## El creciente problema de la resistencia a los antibióticos

Hace no mucho tiempo se creía que la salud humana ya no estaría amenazada por infecciones bacterianas graves. Enfermedades bacterianas como la lepra, la neumonía, la gonorrea, y docenas de otras, se estaban curando con la administración de cualquiera de varios antibióticos —compuestos que matan selectivamente las bacterias sin dañar al huésped humano en el que crecen—. Este asunto ha cambiado drásticamente en las últimas décadas debido a que las bacterias patógenas se han vueðlto cada vez más resistentes a estos “fármacos maravillosos”, lo que ha provocado la muerte de muchas personas que una vez fueron tratadas con éxito. Incluso la tuberculosis, que prácticamente había desaparecido de los países desarrollados, ha resurgido en todo el mundo en una forma conocida como XDR (*extremely drug resistant:* extremadamente resistente a los medicamentos) que es virtualmente intratable. Se teme que la XDR-TB esté a punto de convertirse en una importante crisis de salud global. Para empeorar las cosas, la industria farmacéutica ha reducido considerablemente los recursos dedicados al desarrollo de nuevos antibióticos. Este cambio de acción por parte de la industria por lo general se atribuye a la falta de incentivos financieros: 1) Los antibióticos se toman solo por un corto tiempo (a diferencia de los medicamentos recetados para enfermedades crónicas como la diabetes o la depresión). 2) A diferencia de otros tipos de medicamentos que conservan su eficacia, los nuevos antibióticos corren el riesgo de tener una vida relativamente corta en el mercado, a medida que las bacterias se vuelven resistentes a cada producto sucesivo. 3) Los antibióticos más efectivos son retenidos del uso generalizado, y se mantienen como armas de último recurso cuando otros fármacos han fallado. Las ideas para la formación de instituciones sin fines de lucro para el desarrollo de nuevos antibióticos han sido ampliamente discutidas.

Aquí veremos brevemente el mecanismo de acción de los antibióticos, en particular aquellos que se dirigen a las enzimas, que son los temas de este capítulo, y el desarrollo de la resistencia bacteriana. La mayoría de los antibióticos se derivan de productos naturales, que son producidos por microorganismos que viven en el suelo y se cultivan con facilidad en el laboratorio. La tabla 1 enumera las principales clases de antibióticos, los ejemplos de cada clase, los blancos sobre los que actúan estos compuestos en las células bacterianas y el mecanismo por el cual las bacterias han desarrollado resistencia a ellos. Primero veremos varios de los principales tipos de blancos:

1. *Enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular bacteriana.* La penicilina y sus derivados (p. ej., meticilina) son los análogos estructurales de los sustratos de una familia de transpeptidasas que catalizan las reacciones finales de entrecruzamiento que aportan la rigidez de la pared celular. Si estas reacciones no ocurren, no se desarrolla una pared celular rígida. La penicilina es un inhibidor irreversible de las transpeptidasas; el antibiótico se transforma en el sitio activo de estas enzimas, forma un complejo unido en forma covalente que no puede ser desplazado. El antibiótico vancomicina inhibe la transpeptidación al unirse al sustrato peptídico de la transpeptidasa, en lugar de a la enzima misma. Normalmente, el sustrato de transpeptidasa termina en un dipéptido D-alanina-D-alanina. Para volverse resistente a la vancomicina, una célula bacteriana debe sintetizar un término alternativo que no una el medicamento, que es un proceso indirecto que requiere la adquisición de varias actividades enzimáticas nuevas. Como resultado, la vancomicina es el antibiótico al que las bacterias han demostrado ser menos capaces de desarrollar resistencia y, por tanto, por lo general se administra como último recurso cuando otros antibióticos han fallado. Desafortunadamente, en los últimos años han surgido cepas resistentes de varias bacterias patógenas a la vancomicina, incluyendo el *Staphylococcus aureus*. El *S. aureus* es un habitante común de la piel y las fosas nasales. Aunque por lo general es relativamente inofensivo, este organismo es la causa más frecuente de infecciones potencialmente mortales que se desarrollan en pacientes hospitalizados con heridas abiertas o tubos invasivos. Durante años, las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA, *methicillin-resistant S. aureus*), que también son resistentes a muchos otros antibióticos, han causado estragos en las salas de los hospitales. Las infecciones por esta vía causan

**TABLA 1 Antibióticos en uso clínico y modos de resistencia**

| Clase de antibiótico | Ejemplos | Objetivo | Modo de resistencia |
|---|---|---|---|
| β-lactamas | Penicilinas (ampicilina)<br>Cefalosporinas (cefamicina)<br>Carbapenémicos (meropenem)<br>Monobactámicos (aztreonam) | Biosíntesis de peptidoglicanos | Hidrólisis<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Aminoglucósidos | Gentamicina<br>Estreptomicina<br>Espectinomicina | Traslación | Fosforilación<br>Acetilación<br>Nucleotidilación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Glicopéptidos | Vancomicina<br>Teicoplanina | Biosíntesis de peptidoglucano | Reprogramación de biosíntesis de peptidoglucano |
| Tetraciclinas | Minociclina<br>Tigeciclina | Traslación | Monooxigenación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Marcrólidos | Eritromicina<br>Azitromicina | Traslación | Hidrólisis<br>Glicosilación<br>Fosforilación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Lincosamidas | Clindamicina | Traslación | Nucleotidilación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Estreptograminas | Sinercida | Traslación | Liasa C—O (estreptograminas tipo B)<br>Acetilación (estreptograminas tipo A)<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Oxazolidinones | Linezolid | Traslación | Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Fenicoles | Cloranfenicol | Traslación | Acetilación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Quinolones | Ciprofloxacina | Replicación de DNA | Acetilación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Pirimidinas | Trimetoprima | Replicación de DNA | Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Sulfonamidas | Sulfametoxazol | Replicación de DNA | Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Rifamicinas | Rifampin | Transcripción | ADP-ribosilación<br>Eflujo<br>Objetivo alterado |
| Liopéptidos<br>Péptidos catiónicos | Daptomicina<br>Colistina | Membrana celular<br>Membrana celular | Objetivo alterado<br>Objetivo alterado<br>Eflujo |

De Moror M. y Wright G. D. Enzymology of Antibiotic Resistance. *Annual Review Genet* 2010;44:27. Reproducida con permiso de ANNUAL REVIEWS, INC. En el formato Textbook vía Copyright Clearance Center.

la muerte de más de 10 000 pacientes cada año, solo en Estados Unidos, lo que es mayor que el número de muertes por sida en Estados Unidos. Las infecciones por MRSA también han comenzado a aparecer en entornos comunitarios, como los gimnasios de las escuelas de enseñanza media o las guarderías infantiles, donde hay mucho contacto entre las personas. En muchos casos, la vancomicina es el único medicamento que puede detener estas infecciones. En consecuencia, fue alarmante descubrir que el MRSA se puede volver resistente a la vancomicina al adquirir un grupo de genes de resistencia al antibiótico de otra bacteria (*E. faecium*), que también es una causa común de infecciones en el hospital. Hasta el momento, los casos de MRSA resistentes a la vancomicina son poco frecuentes y estas bacterias no han podido establecerse en un entorno hospitalario o comunitario, pero tal vez solo sea una cuestión de tiempo. Por esta razón, los especialistas en enfermedades infecciosas han instado a los hospitales a instituir mejores programas de higiene, y aislar a los pacientes ante el primer signo de infección. Se ha comprobado que estas prácticas reducen la incidencia de infecciones letales en lugares donde se han implantado, y han reducido la tasa de mortalidad por MRSA en un 50% en los últimos años.

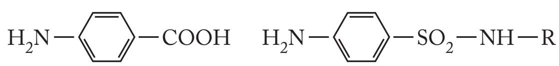
2. *Componentes del sistema por el cual las bacterias duplican, transcriben y traducen su información genética.* Aunque las células bacterianas y eucariotas tienen un sistema similar para almacenar y utilizar información genética, existen muchas diferencias entre los dos tipos de células que los farmacólogos pueden aprovechar. La estreptomicina y las tetraciclinas, por ejemplo, se unen a los ribosomas bacterianos, pero no

(*continúa*)

a los ribosomas eucariotas. Las quinolonas como la ciprofloxacina (Cipro, nombre de marca) son un raro ejemplo de antibióticos totalmente sintéticos (es decir, no se basan en productos naturales). Las quinolonas inhiben la enzima DNA girasa, que se requiere para la replicación del DNA bacteriano.

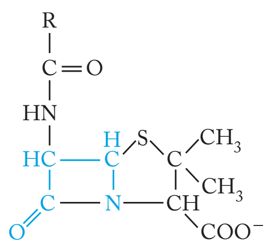
3. *Enzimas que catalizan reacciones metabólicas específicamente en bacterias.* Las sulfonamidas, por ejemplo, son antibióticos efectivos porque se parecen mucho al ácido *p*-aminobenzoico (PABA, *p-aminobenzoic acid*) compuesto, que las bacterias convierten por vía enzimática en la esencial coenzima ácido fólico.

Como los humanos carecen de una enzima sintetizadora de ácido fólico, deben obtener esta coenzima esencial en su dieta; en consecuencia, las sulfamidas no tienen efecto sobre el metabolismo humano.




PABA    Fármacos sulfa

Casi todos los antibióticos “nuevos” aprobados para su uso en los últimos años se derivan de compuestos existentes que han sido modificados químicamente en el laboratorio. En otras palabras, estos compuestos poseen el mismo núcleo o armazón que el compuesto del que se derivan, y por tanto se pueden considerar miembros de la misma clase química. Los fármacos existentes se modifican químicamente en un intento de hacerlos menos vulnerables a los mecanismos de resistencia empleados por las bacterias a las que se dirigen. Se esperaba que la secuenciación de los genomas de las bacterias patógenas a partir de 1995 condujera a la identificación de una serie de nuevos objetivos farmacológicos, pero este no ha sido el caso. Resulta sorprendente que solo se hayan desarrollado y aprobado dos nuevas clases de antibióticos desde 1963. Una de estas dos nuevas clases incluye el antibiótico linezolid (nombre de marca Zyvox), introducido en el año 2000, que actúa específicamente sobre los ribosomas bacterianos e interfiere con la síntesis de proteínas. La otra nueva clase de antibióticos, introducida en 2003 y representada por la daptomicina (marca Cubicin), está formada por lipopéptidos cíclicos que interrumpen la función de la membrana bacteriana. Muchos investigadores esperan que el linezolid y la daptomicina se usen con moderación para mantener al mínimo la resistencia; sin embargo, ya comenzó a aparecer en los hospitales el MRSA resistente al linezolid, y los casos de *E. faecium* resistente a la daptomicina son cada vez más comunes. Así, existe la gran preocupación de estar ingresando rápidamente a una “era posterior a la administración de antibióticos”, en la cual miles o millones de personas volverán a morir por cortes y rasguños menores porque ya no existan antibióticos efectivos.




Penicilina

Las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos a través de varios mecanismos distintos, muchos de los cuales se pueden ilustrar con la penicilina. La penicilina es una β-lactama; es decir, contiene un anillo β-lactama de cuatro miembros (se muestra en color).

En la década de 1940, los investigadores descubrieron que ciertas bacterias poseen una enzima llamada β-lactamasa (o penicilinasa) que puede abrir el anillo de la lactama, lo que hace que el compuesto sea inofensivo para la bacteria. En el momento en que la penicilina se introdujo por primera vez como un antibiótico durante la Segunda Guerra Mundial, ninguna de las principales bacterias causantes de la enfermedad poseía un gen para la β-lactamasa. Esto se puede verificar mediante el examen del DNA de bacterias descendientes de cultivos de laboratorio que se iniciaron en la era preantibiótica. Hoy en día el gen de la β-lactamasa está presente en una amplia variedad de bacterias infecciosas, y la producción de β-lactamasa por estas células es la principal causa de resistencia a la penicilina. ¿Cómo adquirieron estas especies el gen? La aparición generalizada del gen de la β-lactamasa ilustra la facilidad con que los genes se pueden propagar de una bacteria a otra, no solo entre las células de una especie determinada, sino también entre especies. Esto puede suceder de varias maneras, incluida la conjugación (que se muestra en la figura 1-13), en la cual el DNA pasa de una célula bacteriana a otra; la transferencia, en la que un gen bacteriano es transportado de una célula a otra por un virus, y la transformación, en la que una célula bacteriana puede recoger DNA desnudo del medio que lo rodea. Los farmacólogos han intentado contrarrestar la propagación de la β-lactamasa sintetizando derivados de penicilina que son más resistentes a la enzima hidrolítica. La meticilina, que ya no se usa, se produjo por primera vez en 1959 como un antibiótico resistente a la β-lactamasa. Como era de esperar, la selección natural conduce rápidamente a la evolución de bacterias cuya β-lactamasa puede hidrolizar nuevas formas del antibiótico.

No todas las bacterias resistentes a la penicilina han adquirido el gen de la β-lactamasa. Algunas son resistentes porque poseen modificaciones en sus paredes celulares que bloquean la entrada del antibiótico; otras son resistentes porque poseen una *bomba de flujo* que les permite exportar el antibiótico una vez que ha ingresado a la célula; incluso otras son resistentes porque poseen un objetivo alterado, como una transpeptidasa modificada que no se une al antibiótico. La meningitis bacteriana, por ejemplo, es causada por la bacteria *Neisseria meningitidis*, que aún no se ha demostrado haya adquirido la β-lactamasa. Sin embargo, estas bacterias se vuelven resistentes a la penicilina, debido a que sus transpeptidasas han perdido una afinidad por los antibióticos como resultado de mutaciones en el gen que codifica la enzima.

El problema de la resistencia a los medicamentos no se limita a las enfermedades bacterianas, sino que también se ha convertido en un problema importante en el tratamiento del sida. A diferencia de las bacterias, cuyas enzimas de replicación de DNA operan con un alto nivel de precisión, la enzima de replicación del virus del AIDS (HIV, *human immunodeficiency virus*), llamada transcriptasa inversa, comete una gran cantidad de errores, lo que conduce a una alta tasa de mutación. Esta alta tasa de error (aproximadamente un error por cada 10 000 bases duplicadas), combinada con la alta tasa de producción de virus ($>10^8$ partículas de virus producidas en una persona por día), hace muy probable que surjan variantes resistentes a los medicamentos dentro de un individuo a medida que la infección progresa. Este problema se está combatiendo:

- Al hacer que los pacientes tomen varios medicamentos diferentes, dirigidos a diferentes enzimas virales. Esto reduce en gran medida la probabilidad de que surja una variante que sea resistente a todos los fármacos.
- Con el diseño de medicamentos que interactúan con las porciones más altamente conservadas de cada enzima objetivo; es decir, aquellas en que las mutaciones tienen más probabilidades de producir una enzima defectuosa. Este punto subraya la importancia de conocer la estructura y la función de la enzima objetivo, y la manera en que los fármacos potenciales interactúan con ese objetivo.

## 3.9 Una descripción del metabolismo

El **metabolismo** es la colección de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de una célula, que incluye una tremenda diversidad de conversiones moleculares. La mayoría de estas reacciones se pueden agrupar en **vías metabólicas** que contienen una secuencia de reacciones químicas en las que una enzima específica cataliza cada reacción, y el producto de una reacción es el sustrato para la siguiente. Las enzimas que constituyen una vía metabólica por lo general se limitan a una región específica de la célula, como las mitocondrias o el citosol. La creciente evidencia sugiere que las enzimas de una vía metabólica a menudo están físicamente vinculadas entre sí, una característica que permite que el producto de una enzima se administre directamente como sustrato al sitio activo de la siguiente enzima en la secuencia de reacción.

Los compuestos formados en cada paso a lo largo de la ruta son **intermediarios metabólicos** (o *metabolitos*) que conducen finalmente a la formación de un producto final. Los productos finales son moléculas con un papel particular en la célula, como un aminoácido que se puede incorporar a un polipéptido, o un azúcar que se puede consumir por su contenido energético. Las secuencias metabólicas de una célula están interconectadas en varios puntos, de modo que un compuesto generado por una secuencia puede transportarse en varias direcciones, en dependencia de los requisitos de la célula en ese momento. Nos concentraremos en esta sección sobre los aspectos del metabolismo que conducen a la transferencia y uso de la energía química, ya que este tema es uno de los que se desarrolla a lo largo del libro.

Las vías metabólicas se pueden dividir en dos amplios tipos. Las **vías catabólicas** conducen al desmontaje de moléculas complejas para formar productos más simples. Las secuencias catabólicas cumplen dos funciones: ponen a disposición las materias primas a partir de las cuales se pueden sintetizar otras moléculas, y proporcionan la energía química necesaria para las numerosas actividades de una célula. Como se discutirá en detalle, la energía liberada por las secuencias catabólicas se almacena temporalmente en dos formas: como fosfatos de alta energía (principalmente ATP) y como electrones de alta energía (principalmente en nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, NADPH). Las **secuencias anabólicas** conducen a la síntesis de compuestos más complejos a partir de materiales más simples. Las secuencias anabólicas requieren energía y utilizan la energía química liberada por las secuencias catabólicas exergónicas.

La **FIGURA 3-22** muestra un perfil muy simplificado de las formas en que se interconectan las principales secuencias anabólicas y catabólicas. Las macromoléculas primero se desmontan (hidrolizan) en los bloques de construcción de los que están hechas (etapa I, véase figura 3-22). Una vez que las macromoléculas han sido hidrolizadas en sus componentes —aminoácidos, azúcares y ácidos grasos— la célula puede reutilizar los bloques de construcción directamente para 1) formar otras macromoléculas de la misma clase (etapa I); 2) convertirlas en diferentes compuestos para fabricar otros productos, o 3) degradarlas aún más (etapas II y III, véase figura 3-22) y extraer una parte de su contenido de energía libre.

La secuencia de degradación de los diversos bloques de construcción de macromoléculas varía de acuerdo con el compuesto particular que se cataboliza. Sin embargo, en última instancia, todas estas moléculas se convierten en una pequeña variedad de compuestos que se pueden metabolizar de manera similar. Por tanto, aunque las sustancias comienzan como macromoléculas que tienen una estructura muy diferente, mediante secuencias catabólicas se convierten a los mismos metabolitos de bajo peso molecular.

Es notorio que las reacciones químicas y las secuencias metabólicas descritas en este capítulo se encuentran en prácticamente todas las células vivas, desde la bacteria más simple hasta la planta o animal más complejo. Es evidente que estas secuencias aparecieron muy temprano en el transcurso de la evolución biológica, y se han mantenido hasta el momento.

### Oxidación y reducción: un asunto de electrones

Ambas secuencias, catabólicas y anabólicas, incluyen reacciones clave en las que los electrones se transfieren de un reactivo a otro. Las reacciones que implican un cambio en el estado electrónico de los reaccionantes se denominan **reacciones de oxidación-reducción** (o **redox**). Los cambios de este tipo implican la ganancia o pérdida de electrones. Considérese la conversión del hierro metálico ($Fe^0$) al estado ferroso ($Fe^{2+}$), en el cual el átomo de hierro pierde un par de electrones, con lo cual obtiene un estado más positivo. Cuando un átomo pierde uno o más electrones, se dice que se *oxida*. La reacción es reversible, lo que significa que los iones ferrosos se pueden convertir en hierro metálico, un estado más negativo, mediante la adquisición de un par de electrones. Cuando un átomo gana uno o más electrones, se dice que se *reduce*.

Para que se oxide el hierro metálico debe haber alguna sustancia para aceptar los electrones que se liberan. Por el contrario, para que los iones ferrosos se reduzcan, debe haber alguna sustancia para donar los electrones necesarios. En otras palabras, la oxidación de un reaccionante debe ir acompañada de la reducción simultánea de algún otro reaccionante, y viceversa. Una posible reacción que involucre al hierro podría ser

$$Fe^0 + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{2+} + Cu^0$$

La sustancia que se oxida durante una reacción redox, es decir, la que pierde electrones, se llama **agente reductor**, y la que se reduce, o sea, la que gana electrones, se llama **agente oxidante**.

La oxidación o reducción de metales como el hierro o el cobre, implica la pérdida o ganancia completa de electrones. Esto no puede ocurrir en la mayoría de los compuestos orgánicos por la siguiente razón: la oxidación y la reducción de sustratos orgánicos durante el metabolismo celular involucran átomos de carbono que están unidos en forma covalente a otros átomos. Como se discutió en el capítulo 2, cuando dos átomos diferentes comparten un par de electrones, los electrones se atraen más fuertemente a uno de los dos átomos del enlace polarizado. En un enlace C—H, el átomo de carbono tiene la atracción más fuerte en los electrones; por ello, se puede decir que el átomo de carbono está en un estado reducido. Por el contrario, si un átomo de carbono está unido a un átomo más electronegativo, como en un enlace C—O o C—N, los electrones se alejan del átomo de carbono, que está así en estado oxidado. Como el carbono tiene cuatro electrones en la capa externa, que puede compartir con otros átomos, puede existir en una variedad de estados de oxidación. Esto se ilustra mediante el átomo de carbono en una serie de moléculas de un carbono (consúltese **FIGURA 3-23**), que van desde el estado completamente reducido en el metano ($CH_4$) hasta el estado totalmente oxidado en el dióxido de carbono ($CO_2$). El estado relativo de oxidación de una molécula orgánica se puede determinar de forma aproximada contando el número de átomos de hidrógeno *versus* átomos de oxígeno y nitrógeno por átomo de carbono. Como se verá en breve, el estado de oxidación de los átomos de carbono en una molécula orgánica proporciona una medida del contenido de energía libre de la molécula.

### Captura y uso de la energía

Los compuestos que utilizamos como combustibles químicos para hacer funcionar nuestros hornos y automóviles son compuestos orgánicos altamente reducidos, como el gas natural ($CH_4$) y los derivados del petróleo. Se libera energía cuando estas moléculas se queman en presencia de oxígeno, con lo que los carbonos se

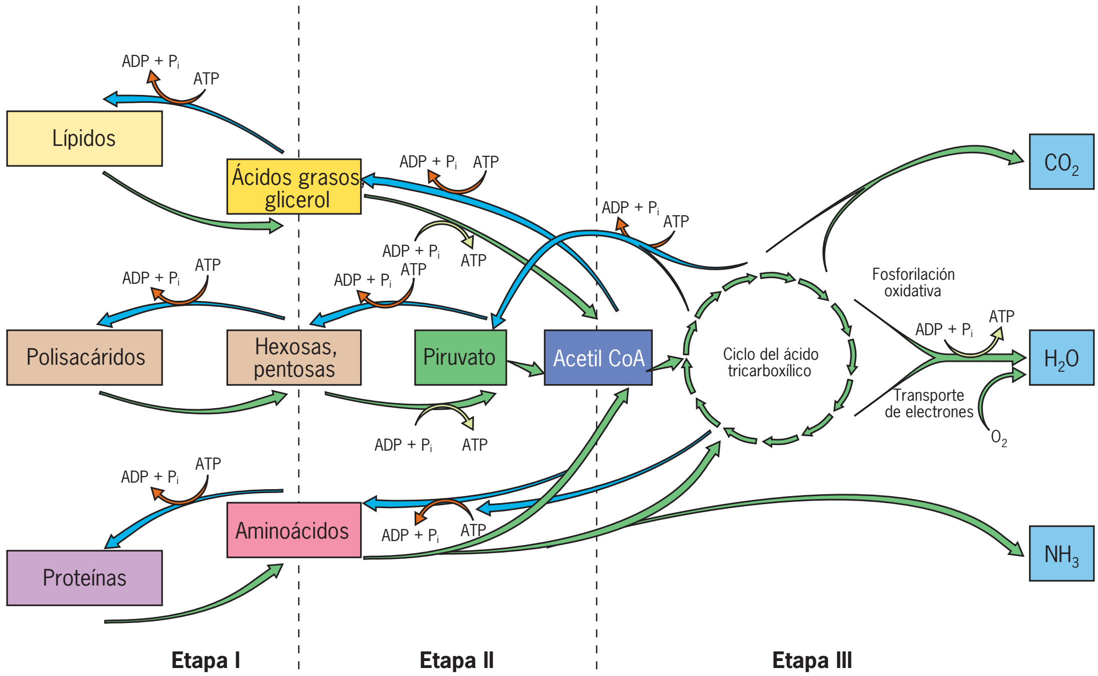



**FIGURA 3-22 Tres etapas metabólicas**. La vía catabólica (flechas verdes hacia la derecha) convergen para formar metabolitos comunes y conducir a la síntesis de ATP en la etapa III. Las vías anabólicas (flechas azules hacia la izquierda) comienzan a partir de ciertos precursores en la etapa III y utiliza ATP para sintetizar gran variedad de materiales celulares. Las vías metabólicas para los ácidos nucleicos son más complejas y no se muestran en esta figura.

convierten en estados más oxidados como el dióxido de carbono y los gases de monóxido de carbono. El grado de reducción de un compuesto también es una medida de su capacidad para realizar trabajo químico dentro de la célula. Cuantos más átomos de hidrógeno puedan extraerse de una molécula de "combustible", mayor será el ATP que finalmente se puede producir. Los carbohidratos son ricos en energía química porque contienen cadenas de unidades (H—C—OH). Las grasas contienen incluso mayor energía por unidad de peso, ya que contienen cadenas de unidades más reducidas (H—C—H). La siguiente discusión se concentrará en los carbohidratos.

Como único componente básico del almidón y el glucógeno, la glucosa es una molécula clave en el metabolismo energético de plantas y animales. La energía libre liberada por la oxidación completa de la glucosa es muy grande:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6H_2O$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -686\,\text{kcal/mol}$$

En comparación, la energía libre requerida para convertir ADP en ATP es relativamente pequeña:

$$\text{ADP} + P_i \rightarrow \text{ATP} + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +7.3\,\text{kcal/mol}$$

Es evidente a partir de estos números que la oxidación completa de una molécula de glucosa a $CO_2$ y $H_2O$ puede liberar suficiente energía para producir una gran cantidad de ATP. Como se verá en el capítulo 5, en las condiciones que existen en la mayoría de las células se forman hasta 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada. Para que se produzcan muchas moléculas de ATP, la molécula de azúcar se desensambla en muchos pasos pequeños. Aquellos pasos en los que la diferencia de energía libre entre los reaccionantes y los productos es relativamente grande

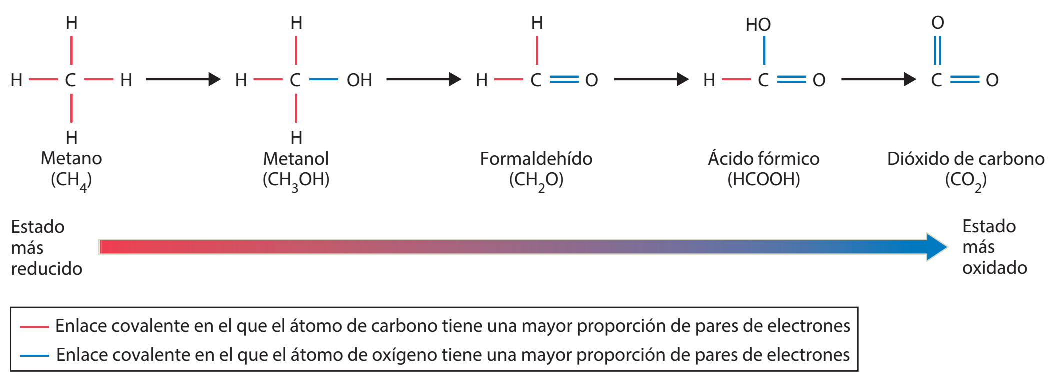



**FIGURA 3-23 El estado de oxidación de un átomo de carbono depende de los otros átomos a los que está unido**. Cada átomo de carbono puede formar un máximo de cuatro enlaces con otros átomos. Esta serie de moléculas simples de carbono ilustra los diversos estados de oxidación en los que puede existir el átomo de carbono. En su estado más reducido, el carbono está unido a cuatro hidrógenos (formando metano); en su estado más oxidado, el átomo de carbono está unido a dos oxígenos (que forman dióxido de carbono).

se pueden combinar con las reacciones que conducen a la formación de ATP.

Básicamente, hay dos etapas en el catabolismo de la glucosa, y son prácticamente idénticas en todos los organismos aeróbicos. La primera etapa, la **glucólisis**, ocurre en la fase soluble del citoplasma (el citosol) y conduce a la formación de piruvato. La segunda etapa es el **ciclo del ácido tricarboxílico** (o **TCA**, *tricarboxylic acid*), que se produce dentro de las mitocondrias de las células eucariotas y el citosol de las procariotas, y conduce a la oxidación final de los átomos de carbono a dióxido de carbono. La mayor parte de la energía química de la glucosa se almacena en forma de electrones de alta energía, que se eliminan a medida que las moléculas del sustrato se oxidan durante la glucólisis y el ciclo del TCA. Es la energía de estos electrones la que finalmente se usa para sintetizar el ATP. Nos concentraremos en las siguientes secciones en los pasos durante la glucólisis, la primera etapa en la oxidación de la glucosa, que ocurre sin la participación de oxígeno. Es de presumir que esta es la vía de captura de energía utilizada por nuestros primeros ancestros anaeróbicos, y sigue siendo la principal secuencia anabólica utilizada por los organismos anaeróbicos que viven hoy en día. Completaremos la historia de la oxidación de la glucosa en el capítulo 5 cuando analicemos la mitocondria y su papel en la respiración aeróbica.

**REPASO**

1. ¿Por qué se describen las secuencias catabólicas como convergentes, mientras que las secuencias anabólicas se describen como divergentes?

## 3.10 Glucólisis y fermentación

Las reacciones de la glucólisis y las enzimas que las catalizan se muestran en la **FIGURA 3-24**. Antes de discutir las reacciones específicas se puede revisar un punto importante sobre la termodinámica del metabolismo. En un debate anterior, se hizo hincapié en la diferencia entre $\Delta G$ y $\Delta G°'$; es el $\Delta G$ para una reacción particular quien determina su dirección en la célula. Las medidas reales de las concentraciones de metabolitos en la célula pueden revelar el valor de $\Delta G$ de una reacción en cualquier momento dado. En la **FIGURA 3-25** aparecen los valores típicos de $\Delta G$ medidos para las reacciones de la glucólisis. En contraste con los valores de $\Delta G°'$ de la figura 3-24, todas las reacciones —excepto tres— tienen valores $\Delta G$ de casi cero; es decir, están cerca del equilibrio. Las tres reacciones que están lejos del equilibrio, lo cual las hace esencialmente irreversibles en la célula, proporcionan la fuerza motriz que mueve los metabolitos a través de la ruta glucolítica de una manera dirigida.

En 1905 dos químicos británicos, Arthur Harden y William Young, estudiaban la descomposición de la glucosa por las células de levadura, un proceso que genera burbujas de $CO_2$. Harden y Young notaron que el burbujeo finalmente disminuyó y se detuvo, a pesar de que quedaba mucha glucosa para metabolizar. Al parecer se estaba agotando algún otro componente esencial de la mezcla. Después de experimentar con varias sustancias, los químicos descubrieron que la adición de fosfatos inorgánicos hacía que la reacción empezara nuevamente. Llegaron a la conclusión de que la reacción estaba agotando el fosfato, primera pista de que los grupos fosfato desempeñaban un papel en las secuencias metabólicas. La importancia del grupo fosfato se ilustra mediante las reacciones iniciales de la glucólisis.

La glucólisis comienza con la unión de azúcar a un grupo fosfato (paso 1, consúltese figura 3-24) a expensas de una molécula de ATP. El uso de ATP en esta etapa se puede considerar una inversión de energía, el costo de ingresar al negocio de oxidación de glucosa. La fosforilación activa el azúcar, por lo que es capaz de participar en reacciones posteriores, mediante las que los grupos de fosfato se mueven y se transfieren a otros aceptores. La fosforilación también atrapa la glucosa dentro de la célula, porque la glucosa fosforilada no puede atravesar la membrana celular. Esto permite que la célula tome más glucosa del entorno circundante. La glucosa 6-fosfato se convierte en fructosa 6-fosfato y luego en fructosa 1,6-bisfosfato a expensas de una segunda molécula de ATP (pasos 2, 3). El bisfosfato de seis carbonos se divide en dos monofosfatos de tres carbonos (paso 4), que establece el escenario para la primera reacción exergónica a la que se puede acoplar la formación de ATP. Pasemos ahora a la formación del ATP.

### Producción de ATP en la glucólisis

El ATP se forma de dos maneras básicamente diferentes, ambas ilustradas por una reacción química de glucólisis: la conversión de gliceraldehído 3-fosfato en 3-fosfoglicerato (pasos 6, 7). La reacción general es la oxidación de un aldehído a un ácido carboxílico (como en la figura 3-23), y ocurre en dos etapas catalizadas por dos enzimas diferentes (véase figura 3-24). La primera de estas enzimas requiere un cofactor no proteico para catalizar la reacción (una coenzima), llamada nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Como se hará evidente en este y en los siguientes capítulos, la NAD desempeña un papel clave en el metabolismo energético al aceptar y donar electrones. La primera reacción [véase **FIGURA 3-26 *a*), *b*)**] es una oxidación-reducción en la que dos electrones y un protón (equivalente a un ion hidruro, $:H^-$) se transfieren del gliceraldehído 3-fosfato (que se oxida) a $NAD^+$ (que se reduce). La forma reducida de la coenzima es NADH (consúltese **FIGURA 3-27**). Una enzima que cataliza este tipo de reacción se denomina **deshidrogenasa**; la enzima que cataliza la reacción anterior es la *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa*. La molécula de NAD, que se deriva de la vitamina niacina, actúa como una coenzima débilmente asociada a la deshidrogenasa en posición de aceptar el ion hidruro (es decir, tanto los electrones como el protón). La NADH formado en la reacción se libera luego de la enzima a cambio de una nueva molécula oxidada $NAD^+$.

Regresaremos a esta reacción en un momento, pero primero continuaremos con las consecuencias de la formación de la NADH. NADH se considera un compuesto de alta energía debido a la facilidad con la que es capaz de transferir electrones a otras moléculas que atraen electrones. (Se dice que la NADH tiene un alto potencial de transferencia de electrones en relación con otros aceptores de electrones en la célula, véase tabla 5-1). Los electrones por lo general se transfieren de la NADH a través de una serie de portadores de electrones incorporados a la membrana, que constituyen una *cadena de transporte de electrones*. A medida que los electrones se mueven a lo largo de esta cadena, se mueven a un estado de energía libre más y más bajo, y finalmente se trasladan al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua. La energía liberada durante el transporte de electrones se utiliza para formar ATP mediante un proceso llamado *fosforilación oxidativa*. El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se explorarán en detalle en el capítulo 5.

Además de la ruta indirecta para la formación de ATP que implica NADH y una cadena de transporte de electrones, la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato incluye una ruta directa para la formación de ATP. En el segundo paso de esta reacción global (etapa 7, véanse figuras 3-24 y 3-26*c*), un grupo fosfato se transfiere del 1,3-bisfosfoglicerato al ADP para formar una molécula de ATP. La enzima *fosfoglicerato quinasa* cataliza la reacción. Esta ruta directa de formación de ATP se denomina **fosforilación a nivel de sustrato** porque se produce por transferencia de un grupo fosfato de uno de los sustratos (en este caso, 1,3-bisfosfoglicerato) al ADP. Las reacciones restantes de la glucólisis (etapas 8-10), que incluyen una segunda fosforilación a nivel de sustrato de ADP (paso 10), se indican en la figura 3-24.

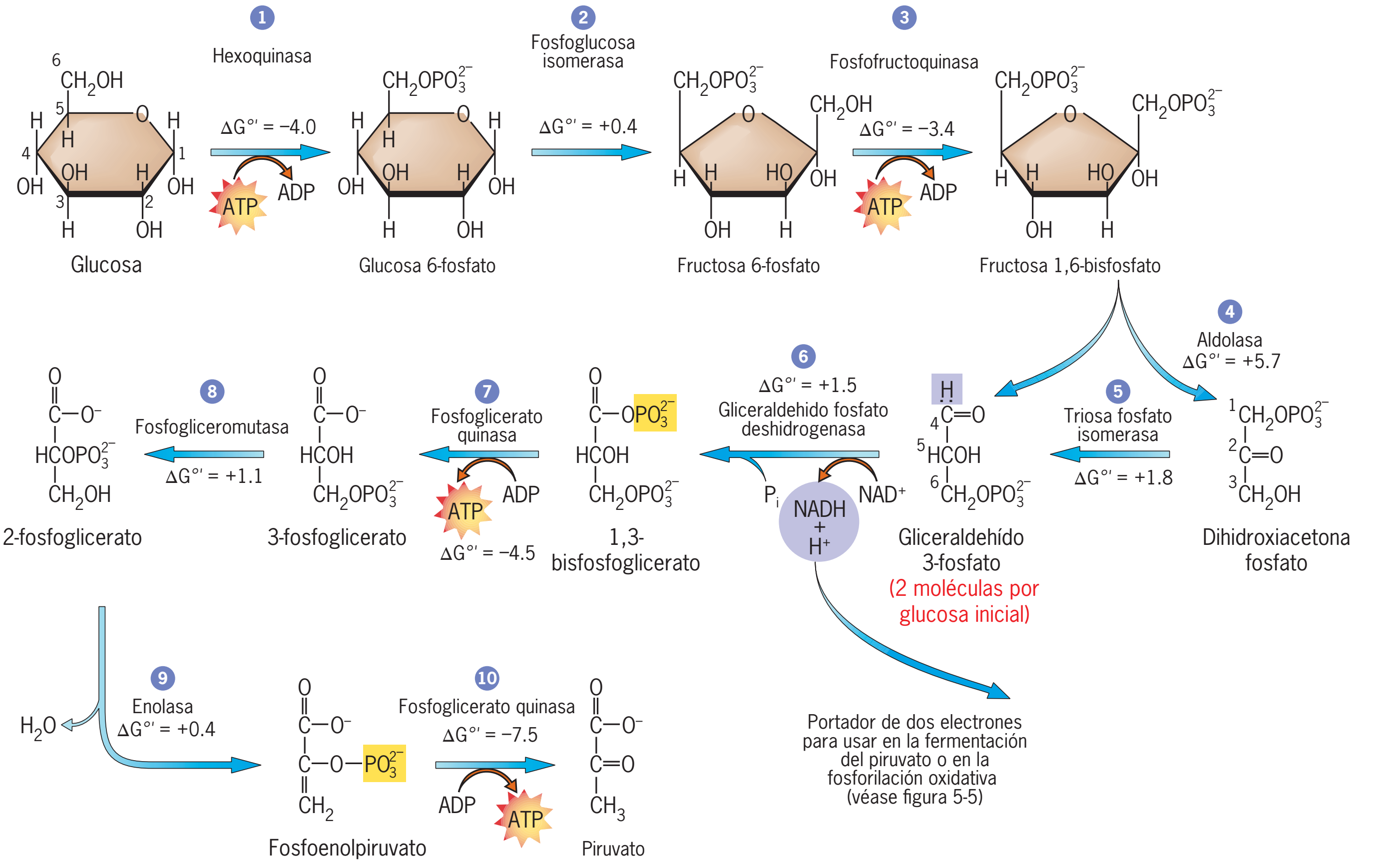



**FIGURA 3-24 Los pasos de la glucólisis.**

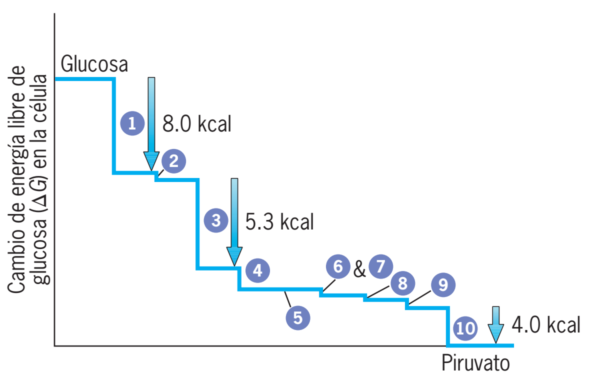


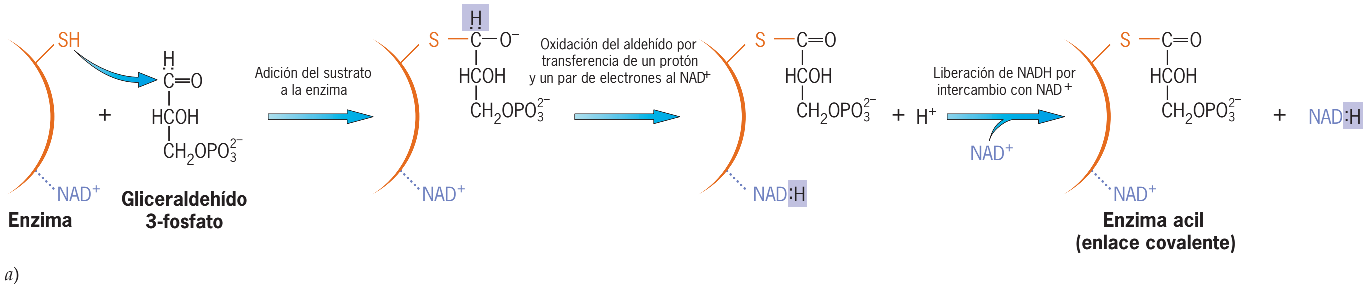

**FIGURA 3-25 Perfil de energía libre de la glucólisis en el tejido del músculo cardiaco.** Los números en los pasos corresponden a las reacciones de la glucólisis que se muestran en la figura 3-24. Todas las reacciones están en el equilibrio o cerca de él, excepto las que catalizan la hexocinasa, la fosfofructocinasa y la piruvato cinasa (reacciones 1, 3 y 10), que presentan grandes diferencias en la energía libre.

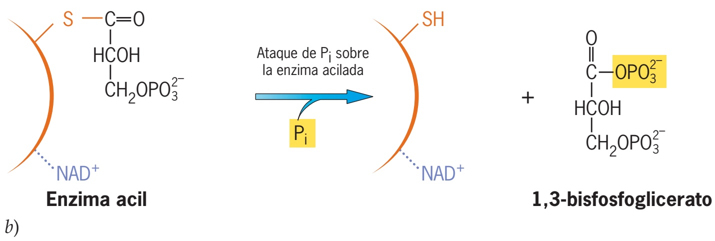
FUENTE: De Voet, Pratt, *Fund of Biochemistry* 4E. Este material se reproduce con el permiso de John Wiley & Sons, Inc.

La fosforilación a nivel de sustrato de ADP ilustra un punto importante sobre el ATP. Su formación no es *tan* endergónica. En otras palabras, el ATP se puede formar con facilidad por reacciones metabólicas. Existen numerosas moléculas fosforiladas cuya hidrólisis tiene un $\Delta G°'$ más negativo que el del ATP. La figura 3-28 ilustra los $\Delta G°'$s relativos para la hidrólisis de varios compuestos fosforilados. Cualquier donante que esté más arriba en la escala se puede usar para fosforilar cualquier molécula que esté más abajo en la escala, y el $\Delta G°'$ de esta reacción será igual a la diferencia entre los dos valores dados en la figura. Por ejemplo, el $\Delta G°'$ para la transferencia de un grupo fosfato de 1,3-bisfosfoglicerato a ADP para formar ATP es igual a –45 kcal/mol (11.8 kcal/mol + 7.3 kcal/mol). Este concepto de **potencial de transferencia** es útil para comparar cualquier serie de donantes y aceptores con independencia del grupo que se transfiera, ya sean protones, electrones, oxígeno o grupos fosfato. Las moléculas que están más arriba en la escala, es decir, las que tienen una mayor energía libre (–$\Delta G°'$s mayores), son moléculas con menos afinidad para el grupo que se transfiere que las que están más abajo en la escala. Cuanto menor sea la afinidad, mejor será el donante; cuanto mayor es la afinidad, mejor es el aceptor.

Una característica importante de la glucólisis es que puede generar un número limitado de moléculas de ATP en ausencia de oxígeno. Ni la fosforilación a nivel de sustrato de ADP por el 1,3-bisfosfoglicerato, ni una posterior por fosfoenolpiruvato (paso 10, consúltese figura 3-24), requieren oxígeno molecular. Así, la glucólisis se puede considerar una **vía anaeróbica** para la producción de ATP, lo que indica que puede proseguir en ausencia de oxígeno molecular para continuar proporcionando ATP. Dos moléculas de ATP se producen por fosforilación del nivel de sustrato durante la glucólisis de cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato oxidado a piruvato. Debido a que cada molécula de glucosa produce dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato, se generan cuatro moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada a piruvato. Por otro lado, dos moléculas de ATP se deben hidrolizar para iniciar la glucólisis, lo que deja una ganancia neta para la célula de dos moléculas de ATP por glucosa oxidada. La ecuación neta para las reacciones de la glucólisis se puede escribir como:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$$



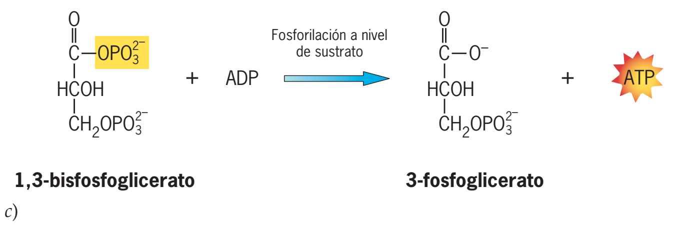




**FIGURA 3-26 Transferencia de energía durante una oxidación química.** La oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato, que es un ejemplo de la oxidación de un aldehído a un ácido carboxílico, se produce en dos etapas catalizadas por dos enzimas. La primera reacción [partes *a*) y *b*)] la cataliza la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que transfiere un ion hidruro (dos electrones y un protón) del sustrato al $NAD^+$. Una vez reducidas, las moléculas de NADH son desplazadas por las moléculas de $NAD^+$ del citosol *a*) y el sustrato unido se fosforila y libera *b*). La enzima fosfoglicerato quinasa cataliza la segunda reacción [parte *c*)], lo cual es un ejemplo de una fosforilación a nivel de sustrato en la que un grupo fosfato se transfiere de una molécula de sustrato, en este caso 1,3-bisfosfoglicerato al ADP, para formar ATP.

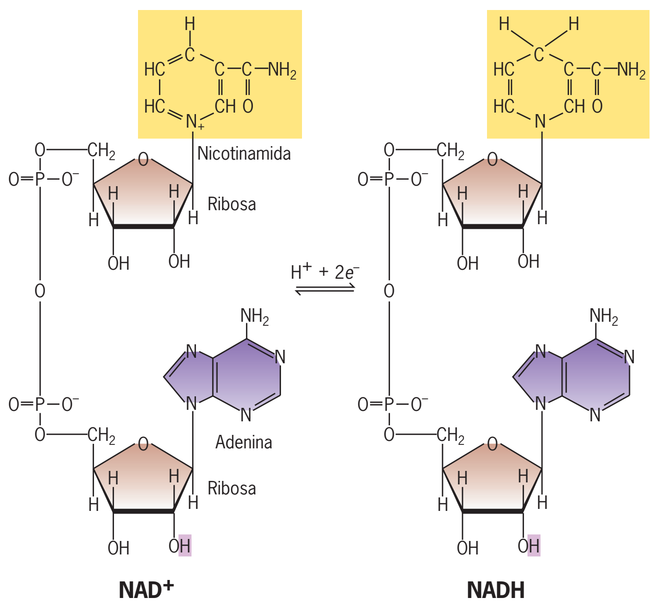



**FIGURA 3-27 La estructura de $NAD^+$ y su reducción a NADH.** Cuando el 2′ OH del resto ribosa (indicado por la pantalla de color púrpura) se une en forma covalente a un grupo fosfato, la molécula es $NADP^+$/NADPH, cuya función se analiza más adelante en este capítulo.

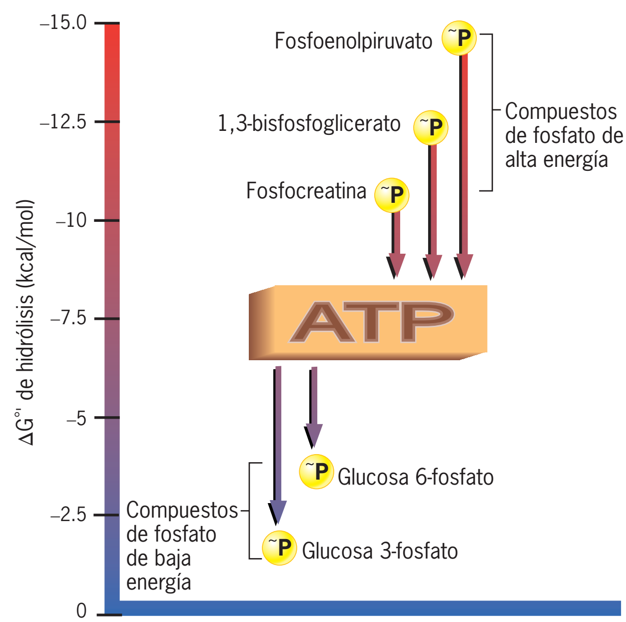



**FIGURA 3-28 Clasificación de compuestos por potencial de transferencia de fosfato.** Aquellos compuestos fosforilados más altos en la escala (los que tienen un ΔG°′ de hidrólisis más negativa) tienen menor afinidad por su grupo fosfato que aquellos compuestos más bajos en la escala. Como resultado, los compuestos más altos en la escala transfieren fácilmente su grupo de fosfato para formar compuestos que están más abajo. Por tanto, los grupos fosfato pueden transferirse de 1,3-bisfosfato o fosfoenolpiruvato a ADP durante la glucólisis.

El piruvato, el producto final de la glucólisis, es un compuesto clave porque se encuentra en la unión entre las vías anaerobia (independiente del oxígeno) y aeróbica (dependiente del oxígeno). En ausencia de oxígeno molecular, el piruvato se somete a fermentación, como se analiza en la siguiente sección. Cuando hay oxígeno disponible, el piruvato se cataboliza adicionalmente mediante la respiración aeróbica, como se discutió en el capítulo 5.

## Oxidación anaeróbica del piruvato: el proceso de fermentación

Hemos visto que la glucólisis puede proporcionar a una célula una pequeña cantidad neta de ATP por cada molécula de glucosa convertida en piruvato. Sin embargo, las reacciones glucolíticas ocurren a velocidades rápidas, de modo que una célula puede producir una cantidad significativa de ATP usando esta secuencia. De hecho, varias células, incluidas las células de levadura, las células tumorale y las células musculares, dependen en gran medida de la glucólisis como medio para la formación de ATP. Sin embargo, hay un problema que deben enfrentar estas células. Uno de los productos de la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato es el NADH. La formación de NADH ocurre a expensas de uno de los reaccionantes, $NAD^+$, que es escaso en las células. Debido a que el $NAD^+$ es un reaccionante requerido en este importante paso de la glucólisis, debe regenerarse a partir del NADH. Si no, la oxidación de gliceraldehído 3-fosfato ya no puede tener lugar, ni puede ninguna otra de las reacciones sucesivas de la glucólisis. Pero el NADH no se puede oxidar a $NAD^+$ por medio de la cadena de transporte de electrones sin oxígeno, porque el oxígeno es el aceptor de electrones final de la cadena. Sin embargo, las células las pueden regenerar el $NAD^+$ por **fermentación**, mediante la transferencia de electrones del NADH al piruvato, el producto final de la glucólisis, o a un compuesto derivado del piruvato (véase **FIGURA 3-29**). Al igual que la glucólisis, la fermentación tiene lugar en el citosol. Para la mayoría de los organismos que dependen del $O_2$, la fermentación es una medida provisional para regenerar el $NAD^+$ cuando los niveles de $O_2$ son bajos, de manera que la glucólisis puede continuar y se puede mantener la producción de ATP.

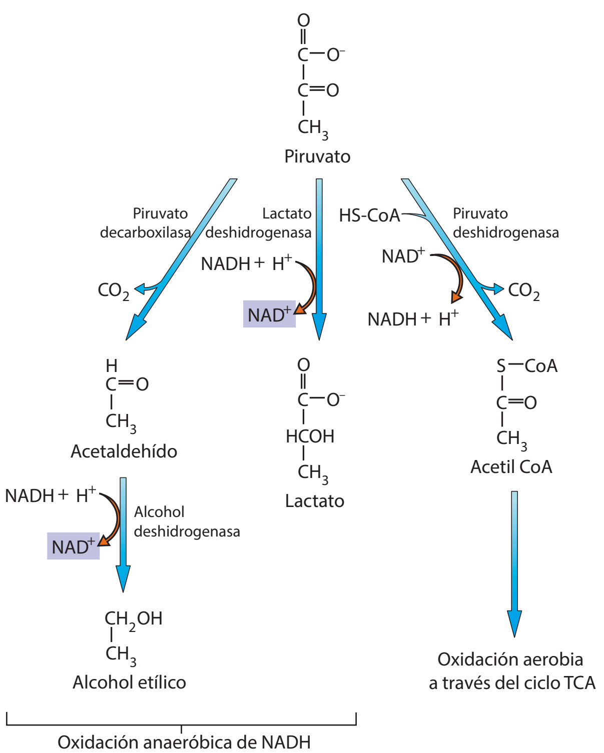



**FIGURA 3-29 Fermentación**. La mayoría de las células llevan a cabo una respiración aeróbica, que depende del oxígeno molecular. Si los suministros de oxígeno disminuyen, como ocurre en una célula de músculo esquelético sometida a una contracción extenuante, o en una célula de levadura que vive en condiciones anaeróbicas, estas células pueden regenerar $NAD^+$ por fermentación. Las células musculares logran la fermentación por formación de lactato, mientras que las células de levadura lo hacen mediante la formación de etanol. La oxidación aeróbica de piruvato mediante el ciclo de TCA se discute extensamente en el capítulo 5.

El producto de la fermentación varía de un tipo de célula u órgano a otro. Cuando se requiere que las células musculares se contraigan repetidamente, el nivel de oxígeno se vuelve demasiado bajo para mantener el ritmo de las demandas metabólicas de la célula. En estas condiciones, las células del músculo esquelético regeneran el $NAD^+$ al convertir el piruvato en lactato. Cuando el oxígeno vuelve a estar disponible en cantidades suficientes, el lactato se puede convertir nuevamente en piruvato para continuar la oxidación. Las células de levadura han enfrentado los desafíos de la vida anaeróbica con una solución metabólica diferente: convierten el piruvato en etanol, como se ilustra en la figura 3-29.

Aunque la fermentación es un complemento necesario para el metabolismo en muchos organismos, y la única fuente de energía metabólica en algunos anaerobios, la energía obtenida solo con la glucólisis es escasa si se compara con la oxidación completa de glucosa a dióxido de carbono y agua. Cuando 1 mol de glucosa se oxida por completo, se liberan 686 kilocalorías. Por el contrario, solo se liberan 57 kilocalorías cuando esta misma cantidad de glucosa se convierte en etanol en condiciones estándar, y solo se liberan 47 kilocalorías cuando se convierte en lactato. En cualquier caso, solo se forman dos moléculas de ATP por glucosa oxidada por glucólisis y fermentación; más de 90% de la energía simplemente se descarta en el producto de fermentación (como lo demuestra la inflamabilidad del alcohol etílico).

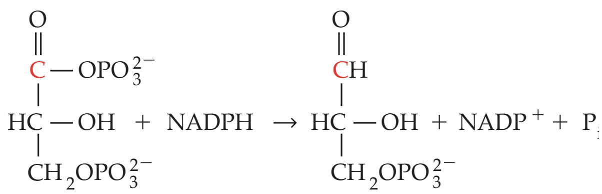
Durante las primeras etapas de la vida en la Tierra, cuando aún no había aparecido oxígeno, la glucólisis y la fermentación fueron probablemente las secuencias metabólicas primarias mediante las cuales las células procariotas primitivas extraían la energía de los azúcares. Tras la aparición de la cianobacteria, el oxígeno de la atmósfera aumentó drásticamente y se hizo posible la evolución de una estrategia metabólica aeróbica. Como resultado, los productos de la glucólisis se podrían oxidar por completo y se podría cosechar mucho más ATP. Veremos cómo se logra esto en el capítulo 5, donde se discute la estructura y la función de la mitocondria.

### REPASO

1. Compare la energía que obtiene una célula que oxida la glucosa de forma anaeróbica y aeróbica. ¿Cuál es la diferencia en los productos finales de estos dos tipos de metabolismo?
2. Explique qué se entiende por potencial de transferencia de fosfato. ¿Cómo se compara el potencial de transferencia de fosfato del fosfoenolpiruvato con el del ATP? ¿Qué significa esto termodinámicamente (es decir, en términos de los $\Delta G°'$ relativos de hidrólisis)? ¿Qué significa en términos de afinidad para los grupos fosfato?
3. En la reacción en la que el gliceraldehído 3-fosfato se oxida a 3-fosfoglicerato, ¿qué compuesto actúa como agente reductor? ¿Cuál como agente oxidante? ¿Qué compuesto se oxida? ¿Cuál está siendo reducido?
4. ¿Qué reacciones de la glucólisis se combinan con la hidrólisis del ATP? ¿Qué reacciones implican la fosforilación a nivel de sustrato? ¿Qué reacciones dependen de la fermentación o la respiración aeróbica para continuar?

# 3.11 Poder reductor

La energía requerida para sintetizar moléculas biológicas complejas, como proteínas, grasas y ácidos nucleicos, se deriva en gran medida del ATP generado por la glucólisis y el transporte de electrones. Pero muchos de estos materiales, en particular las grasas y otros lípidos, están más reducidos que los metabolitos a partir de los cuales se fabrican. La síntesis de grasas requiere la reducción de metabolitos, que se logra mediante la transferencia de electrones de alta energía desde el NADPH, un compuesto similar en estructura a NADH, pero que contiene un grupo fosfato adicional (descrito en la leyenda de la figura 3-27). El reservorio de NADPH de una célula representa su **poder reductor**, que es una medida importante del contenido de energía utilizable de la célula. El uso del NADPH se puede ilustrar mediante una de las reacciones clave de la fotosíntesis:



1,3-bisfosfoglicerato    Gliceraldehído 3-fosfato

En esta reacción un par de electrones (junto con un protón) se transfieren del NADPH al sustrato 1,3-bisfosfoglicerato, y se reduce un átomo de carbono (indicado en rojo).

La forma oxidada del NADPH, $NADP^+$, se forma a partir del $NAD^+$ en la siguiente reacción:

$$NAD^+ + ATP \rightleftharpoons NADP^+ + ADP$$

El NADPH puede formarse mediante la reducción del NADP. Como el NADH, el NADPH es un compuesto de alta energía debido a su elevado potencial de transferencia de electrones. La transferencia de energía libre en la forma de estos electrones eleva al aceptor a un estado más reducido y enérgico.

La separación del poder reductor en dos moléculas distintas pero relacionadas, NADH y NADPH, refleja una separación de sus funciones metabólicas primarias. Diferentes enzimas reconocen el NADH y NADPH como coenzimas. Las enzimas que tienen un papel reductor en las secuencias anabólicas utilizan el NADPH como su coenzima, mientras que las enzimas que actúan como deshidrogenasas en las secuencias catabólicas utilizan el $NAD^+$. Aunque se usan de manera diferente, una coenzima puede reducir a la otra en la siguiente reacción, que es catalizada por la enzima *transhidrogenasa*:

$$NADH + NADP^+ \rightleftharpoons NAD^+ + NADPH$$

Cuando hay abundante energía se favorece la producción de NADPH, que proporciona el suministro de electrones necesarios para la biosíntesis de nuevas macromoléculas esenciales para el crecimiento. Sin embargo, cuando los recursos energéticos son escasos, la mayoría de los electrones de alta energía del NADH se "cambian" para el ATP, y solo se genera suficiente NADPH para cumplir con los requisitos mínimos de biosíntesis de la célula.

**REPASO**

1. ¿Por qué se considera el poder reductor una forma de energía?

# 3.12 Regulación metabólica



La cantidad de ATP presente en una célula en un momento dado es sorprendentemente pequeña. Una célula bacteriana, por ejemplo, contiene aproximadamente un millón de moléculas de ATP, cuya vida media es muy breve (del orden de uno o dos segundos). Con un suministro tan limitado, es evidente que el ATP no es una molécula en la que se almacena una gran cantidad total de energía libre. En su lugar, las reservas de energía de una célula se almacenan como polisacáridos y grasas. Cuando los niveles de ATP comienzan a caer, las reacciones se ponen en marcha para aumentar la formación de ATP a expensas de las formas de almacenamiento ricas en energía. De manera similar, cuando los niveles de ATP son altos, se inhiben las reacciones que normalmente conducirían a la producción de ATP. Las células regulan estas importantes reacciones de liberación de energía mediante el control de ciertas enzimas clave en una serie de secuencias metabólicas.

La función de una proteína está estrechamente relacionada con su estructura (es decir, su conformación). No es sorprendente, por tanto, que las células regulen la actividad proteica al modificar la conformación de moléculas clave de proteína. En el caso de las enzimas, la regulación de la actividad catalítica se centra en la modificación de la estructura del sitio activo. Dos mecanismos comunes para alterar la forma del sitio activo de una enzima son la modificación covalente y la modulación alostérica, que desempeñan un papel clave en la regulación de la oxidación de la glucosa.[4]

## Alteración de la actividad enzimática mediante la modificación covalente

A mediados de la década de 1950, Edmond Fischer y Edwin Krebs, de la Universidad de Washington, estudiaban la glucógeno fosforilasa, una enzima que se encuentra en las células musculares y que desarticula el glucógeno en sus subunidades de glucosa. La enzima podría existir en un estado inactivo o activo. Fischer y Krebs prepararon un extracto crudo de células musculares, y encontraron que las moléculas inactivas de la enzima en el extracto podían convertirse en activas al agregar simplemente ATP al tubo de ensayo. Un análisis posterior reveló una segunda enzima en el extracto —una "enzima convertidora", como la llamaron— que transfirió un grupo fosfato del ATP a uno de los 841 aminoácidos que componen la molécula de glucógeno fosforilasa. La presencia del grupo fosfato alteró la forma del sitio activo de la molécula de la enzima y aumentó su actividad catalítica. La investigación posterior ha demostrado que la modificación covalente de enzimas, como se ilustra por la adición (o eliminación) de fosfatos, es un mecanismo general para cambiar la actividad de las enzimas. Las enzimas que transfieren grupos de fosfato a otras proteínas se denominan **proteínas quinasas** y regulan actividades tan diversas como la acción de hormonas, la división celular y la expresión génica. La "enzima convertidora" descubierta por Krebs y Fischer se llamó más tarde fosforilasa quinasa, y su regulación se discute en la sección 15.8. Hay dos tipos de proteínas quinasas básicamente diferentes: un tipo agrega grupos fosfato a residuos específicos de tirosina en una proteína sustrato; el otro tipo agrega fosfatos a residuos específicos de serina o treonina en el sustrato. La importancia de las proteínas quinasas se refleja en el hecho de que aproximadamente 2% de todos los genes de una célula de levadura (113 de aproximadamente 6 200) codifican miembros de esta clase de enzimas.

[4] El metabolismo también se regula controlando las concentraciones de enzimas. Las tasas relativas según las cuales las enzimas son sintetizadas y degradadas se consideran en los capítulos siguientes.

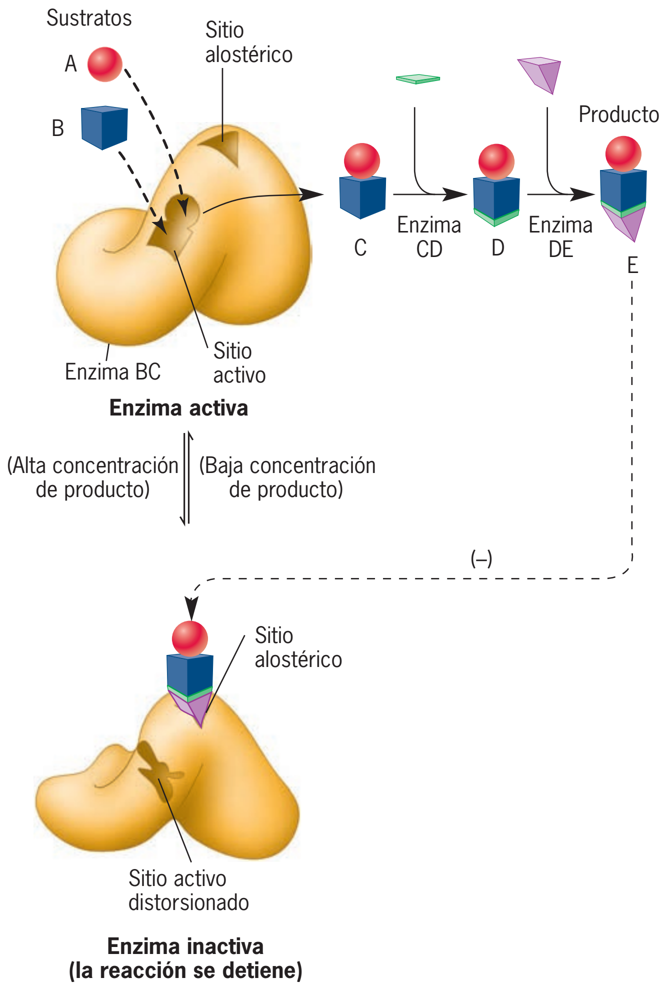



**FIGURA 3-30 Inhibición de retroalimentación**. El flujo de metabolitos a través de una ruta metabólica se detiene cuando la primera enzima de la secuencia (enzima BC) es inhibida por el producto final de esa secuencia (compuesto E), que se une a un sitio alostérico en la enzima. La inhibición de retroalimentación evita que una célula desperdicie recursos al continuar produciendo compuestos que ya no son necesarios.

### La alteración de la actividad enzimática mediante modulación alostérica

La **modulación alostérica** es un mecanismo por el cual la actividad de una enzima es inhibida o estimulada por un compuesto que se une a un sitio, llamado **sitio alostérico**, que es distinto espacialmente del sitio activo de la enzima. Según un punto de vista, la unión de un compuesto al sitio alostérico envía una "ondulación" a través de la proteína, lo que produce un cambio definido en la forma del sitio activo, que puede estar ubicado en el lado opuesto de la enzima, o incluso en un polipéptido diferente dentro de la molécula de proteína. Dependiendo de la enzima particular y del modulador alostérico particular, el cambio en la forma del sitio activo puede estimular o inhibir su capacidad de catalizar la reacción. La modulación alostérica ilustra la relación íntima entre la estructura molecular y su función. Los cambios muy pequeños en la estructura de la enzima inducida por el modulador alostérico pueden causar cambios notables en la actividad de la enzima.

Las células son plantas de fabricación altamente eficientes, que no desperdician energía y materiales produciendo compuestos que no se utilizan. Uno de los mecanismos principales que usan las células para cerrar las líneas de ensamblaje anabólico es un tipo de modulación alostérica llamada **inhibición de retroalimentación**, en la cual la enzima que cataliza el primer paso comprometido en una ruta metabólica se inactiva temporalmente cuando la concentración del producto final de esa secuencia —por ejemplo, un aminoácido— alcanza un cierto nivel. Esto se ilustra mediante la ruta simple representada en la **FIGURA 3-30**, en la que dos sustratos —A y B— se convierten en el producto final E. A medida que aumenta la concentración del producto E, se une al sitio alostérico de la enzima BC y causa un cambio de conformación en el sitio activo, que disminuye la actividad de la enzima. La inhibición de la retroalimentación ejerce un control inmediato y sensible sobre la actividad anabólica de una célula.

**REPASO**

1. ¿Cómo se relacionan los niveles de AMP y ATP en una célula? ¿Un alto ATP inhibe la glucólisis?, ¿o lo hace un alto AMP?

## 3.13 Separación de las vías anabólica y catabólica

Una breve consideración de la ruta anabólica que lleva a la síntesis de la glucosa (**gluconeogénesis**) ilustrará algunos aspectos importantes sobre las vías de síntesis. La mayoría de las células pueden sintetizar glucosa a partir del piruvato, al mismo tiempo que oxidan la glucosa como su principal fuente de energía química. ¿Cómo pueden las células utilizar estas dos secuencias opuestas? El primer punto importante es que, a pesar de que las enzimas pueden catalizar una reacción en ambas direcciones de la glucólisis, las reacciones de la gluconeogénesis no pueden proceder simplemente por la inversión de las reacciones de glucólisis. La vía glucolítica contiene tres reacciones termodinámicamente irreversibles (véase figura 3-25), y estos pasos se deben soslayar de alguna manera. Incluso si todas las reacciones de la glucólisis se pudieran revertir, sería una forma muy indeseable para que la célula maneje sus actividades metabólicas, porque las dos vías no podrían controlarse con independencia una de la otra. Por tanto, una célula no podría cerrar la síntesis de glucosa y aumentar su descomposición, porque las mismas enzimas estarían activas en ambas direcciones.

Si se compara la secuencia por la cual la glucosa se degrada con la secuencia por la que se sintetiza la glucosa, es evidente que algunas de las reacciones son idénticas, aunque se ejecutan en direcciones opuestas, mientras que otras son muy diferentes (pasos 1 a 3, véase **FIGURA 3-31**). Mediante el uso de diferentes enzimas para catalizar distintas reacciones clave en las dos vías opuestas, una célula puede resolver los problemas termodinámicos y regulatorios inherentes a la capacidad de fabricar y degradar las mismas moléculas.

Podemos ver esto mejor al observar más de cerca las enzimas clave de la glucólisis y la gluconeogénesis. Como se indica en el paso 2 de la figura 3-31, la *fosfofructoquinasa*, una enzima de la glucólisis, cataliza la reacción

$$\text{Fructosa 6-fosfato + ATP} \rightleftharpoons \text{fructosa 1,6 bisfosfato + ADP}$$

que tiene un $\Delta G°'$ de –3.4 kcal/mol, por lo que es esencialmente irreversible. La reacción tiene un $\Delta G°'$ tan grande porque está acoplada a la hidrólisis del ATP. En la gluconeogénesis, la formación de fructosa 6-fosfato está catalizada por la enzima *fructosa 1,6-bisfosfatasa* mediante una hidrólisis simple:

$$\text{fructosa 1,6-bisfosfato} + H_2O \rightleftharpoons$$

$$\text{fructosa 6-fosfato} + P_i \quad \Delta G°' = -3.9 \text{ kcal/mol}$$

Las enzimas particulares de glucólisis y gluconeogénesis descritas anteriormente son enzimas clave en sus rutas respectivas.

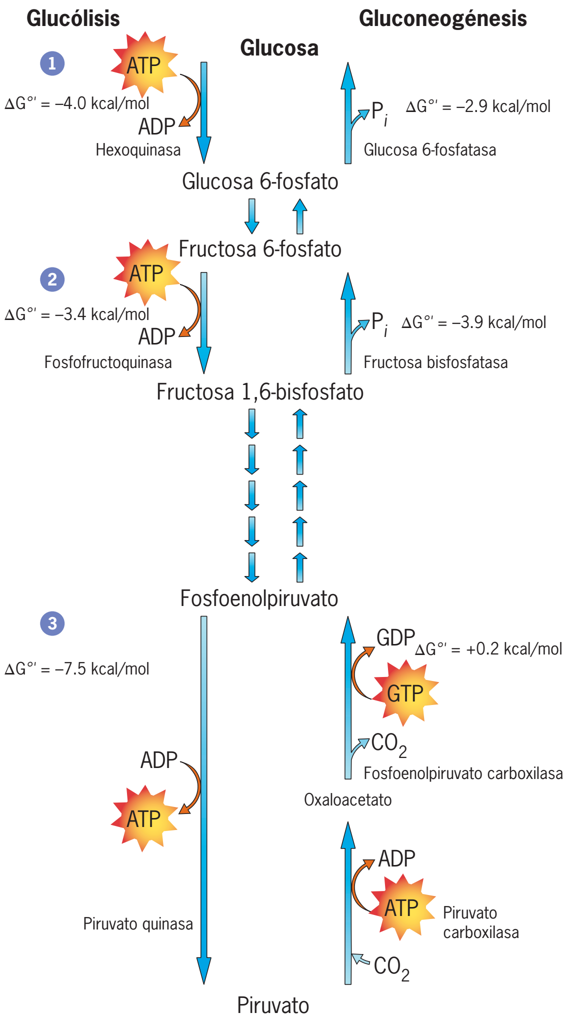



**FIGURA 3-31 Glucólisis *versus* gluconeogénesis**. Mientras que la mayoría de las reacciones son las mismas en las dos vías aunque se ejecutan en direcciones opuestas, las tres reacciones irreversibles de la glucólisis (pasos 1 a 3 aquí) se reemplazan en la ruta gluconeogénica por diferentes reacciones favorecidas termodinámicamente.

Estas enzimas están en parte reguladas por el AMP y el ATP. Téngase en cuenta que la concentración de AMP dentro de las células está relacionada inversamente con la concentración de ATP; cuando los niveles de ATP son bajos, los niveles de AMP son altos y viceversa. En consecuencia, las concentraciones elevadas de AMP indican a la célula que sus reservas de combustible de ATP se están agotando. Cuando los niveles de ATP son altos, la actividad de la enzima disminuye, por lo que no se forma ATP adicional por glucólisis. A la inversa, cuando los niveles de ADP y AMP son altos en relación con el ATP, la actividad de la enzima aumenta, lo que promueve la síntesis de ATP. En contraste, la actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, una enzima clave de la gluconeogénesis, se inhibe por los niveles elevados de AMP.

La importancia de la modulación alostérica en el control metabólico está ilustrada por estudios recientes sobre la enzima proteína quinasa AMP-activada (AMPK, *AMP-activated protein kinase*). Al igual que la fosforilasa quinasa discutida anteriormente, la AMPK controla la actividad de otras enzimas mediante la adición de grupos de fosfato a residuos específicos de serina o treonina dentro de su estructura. La actividad de la AMPK está controlada por modificaciones postraslacionales; la enzima se activa mediante la adición de un grupo fosfato, y se inhibe mediante la eliminación de ese grupo fosfato. Más importante aún para la presente discusión, la AMPK también se activa tanto por el AMP como por el ADP, los dos productos alternativos de la hidrólisis del ATP. El AMP activa la AMPK uniéndose a un sitio alostérico en la enzima, y el ADP activa la AMPK al bloquear la eliminación del grupo fosfato mencionado anteriormente. A medida que aumentan las concentraciones de AMP o ADP, se activa la AMPK, lo que provoca que fosforile e inhiba las enzimas clave implicadas en las secuencias anabólicas, mientras que al mismo tiempo fosforila y activa las enzimas clave en las secuencias catabólicas. El resultado final de la activación de la AMPK es una disminución en la actividad de las secuencias que consumen ATP, y un aumento en la actividad de las secuencias que producen ATP, lo que lleva a una elevación en la concentración de ATP dentro de la célula.

La AMPK está involucrada no solo en la regulación de la energía celular sino, al menos en los mamíferos, en la regulación del balance de energía en todo el cuerpo. En los mamíferos, el apetito está controlado por centros dentro del hipotálamo cerebral que responden a los niveles de ciertos nutrientes y hormonas dentro de la sangre. Una caída en los niveles de glucosa en sangre, por ejemplo, actúa sobre el hipotálamo para estimular el apetito, que parece estar mediado por la activación de la AMPK en las células nerviosas hipotalámicas. Por el contrario, se cree que la sensación de estar "lleno" que se experimenta después de comer se debe a ciertas hormonas (p. ej., la leptina secretada por las células grasas) que inhiben la actividad de la AMPK en esas mismas células cerebrales. Debido a su papel como "termostato de energía", la AMPK se ha convertido en un objetivo principal en el desarrollo de medicamentos para tratar la obesidad y la diabetes. La metformina, fármaco contra la diabetes, activa la AMPK, lo que lleva a la supresión de la gluconeogénesis en el hígado y la consiguiente disminución en los niveles de glucosa en la sangre.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son dos mecanismos comunes para regular la actividad de una enzima cambiando la conformación de su sitio activo?



# 3.14 PERSPECTIVA HUMANA

## Restricción calórica y longevidad

En el capítulo 2 se discutió la teoría de que el envejecimiento resulta del daño acumulado causado por los radicales libres. Aquí consideraremos otro aspecto del envejecimiento, a saber, la observación de que la ingesta calórica reducida en muchos animales modelo puede aumentar su longevidad y, al parecer, ralentizar el proceso de envejecimiento.

La red metabólica ilustrada en la figura 3-22 toca cada vía bioquímica en la célula y cada aspecto de la fisiología humana,

(*continúa*)

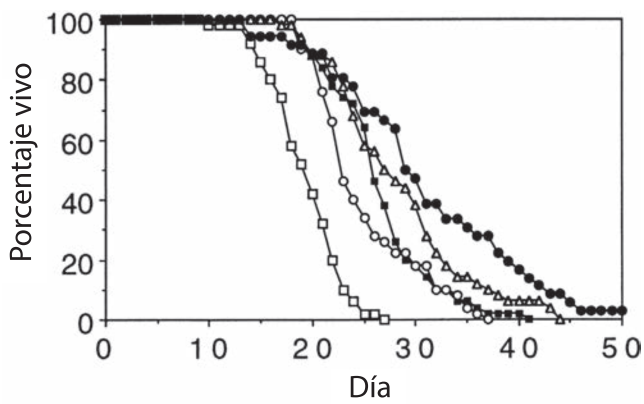



**FIGURA 1** Comer menos alimentos ayuda a los gusanos nematodos a vivir más tiempo. Este gráfico, conocido como curva de Kaplan-Meier, muestra el porcentaje de animales que todavía están vivos en un número determinado de días después del nacimiento. Eventualmente, las curvas caen a cero ya que hay un límite superior de cuánto puede vivir cualquier animal. La mejora de la longevidad se indica mediante curvas que se desplazan hacia la derecha, porque eso significa que un mayor porcentaje de individuos que el de los animales normales sigue vivo a una edad determinada. Este gráfico muestra cuatro tipos de gusanos mutantes que comen menos porque su faringe —su órgano de alimentación— no funciona correctamente. A modo de comparación, los gusanos normales se trazan en la curva indicada con los cuadrados blancos. Mientras que los gusanos normales viven en promedio por alrededor de 20 días, la esperanza de vida de los mutantes que comen menos aumenta a 30 días.

FUENTE: B. Lakowski y S. Hekimi. 1998. The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans. *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A. 95:13091-13096.

por lo que no parece sorprendente que las alteraciones en la actividad metabólica general puedan tener grandes efectos en nuestra salud y bienestar. Un ejemplo importante es el posible vínculo entre la actividad metabólica y la esperanza de vida. La idea inicial de que la ingesta calórica reducida podría conducir a una vida más larga provino de estudios en ratas y ratones. Alimentar a los animales con un 10-30% menos de comida les permitió tener vidas más largas, con un aumento tanto en la esperanza de vida promedio como en la esperanza de vida máxima. El efecto fue dramático, pero estos estudios dejaron dos preguntas sin respuesta. Primero, ¿cuál es el mecanismo molecular y celular del efecto?, y segundo, ¿se vería el mismo efecto en los humanos?

Los estudios del mecanismo de restricción calórica han explotado poderosos organismos modelo como la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y los gusanos nematodos (*Caenorhabditis elegans*). Estos organismos tienen vidas cortas, por lo que los experimentos se pueden hacer más rápidamente que en ratas o ratones, y con mucho menos dinero. Además, los tres primeros modelos tienen una genética fuerte y conveniente que permite que los genes se identifiquen mucho más fácilmente que en los roedores. Cuidadosos experimentos confirmaron que la restricción calórica aumenta la vida útil de las moscas y las lombrices, como se observó en los roedores (**FIGURA 1**). Los experimentos genéticos en estos sistemas modelo han identificado una variedad de genes que median el efecto de restricción calórica sobre el envejecimiento. Un resultado interesante de estos experimentos ha sido que diferentes genes están involucrados en el efecto, en dependencia de en qué momento de la vida se aplica la restricción calórica, sugiriendo por ejemplo que la restricción calórica de por vida *versus* la restricción calórica aplicada más tarde en la vida podría actuar a través de diferentes vías genéticas. Los estudios del organismo modelo también han indicado que la restricción calórica puede aumentar la producción de oxígeno reaccionante. Como se discutió en la sección 2.2, se ha asumido durante mucho tiempo que los radicales de oxígeno aceleran el envejecimiento, pero los experimentos han demostrado que lo opuesto a veces puede ser cierto, y que los radicales de oxígeno en realidad pueden proporcionar protección contra el envejecimiento. La mayor longevidad lograda durante la restricción calórica puede implicar este último tipo de efecto protector.

Con independencia del mecanismo molecular, la posibilidad de que el envejecimiento se retrase en los humanos por algo tan simple como una reducción del 20% en la ingesta calórica es tremendamente excitante. Aunque comer mucho menos calorías sería desafiante, como puede atestiguar cualquiera que haya estado a dieta, la promesa de poder retrasar o prevenir muchas de las complicaciones del envejecimiento sería un atractivo poderoso. Para preguntar si la restricción calórica era efectiva en animales más similares a los humanos que los roedores usados previamente, se iniciaron dos grandes estudios en la década de 1980 con monos Rhesus, uno en el Centro Nacional de Investigación de Primates de Wisconsin (WNPRC, *Wisconsin National Primate Research Center*) y otro en el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento (NIA, *National Institute of Aging*), parte del NIH. Debido a que los primates tienen una esperanza de vida mucho más larga que los ratones o las ratas (sin mencionar los gusanos o las moscas), estos experimentos tuvieron que realizarse durante décadas. Los dos estudios dieron resultados diferentes: el estudio del WNPRC mostró un aumento en la vida útil de los monos con restricción calórica, mientras que el estudio del NIA no mostró ningún efecto. Una diferencia importante entre los dos estudios es que el estudio del NIA alimentó a los monos con alimentos basados en ingredientes naturales, mientras que el WNPRC utilizó un alimento sintético hecho de componentes purificados como la lactoalbúmina y la sacarosa. Suponiendo que los ingredientes más naturales hacen que los alimentos sean más saludables, tal vez reducir el consumo de alimentos poco saludables en el estudio del WNPRC puede haber tenido un impacto positivo en la duración de la vida, al reducir las muertes causadas por enfermedades cardiacas y otras dolencias.

Lo que acordaron ambos estudios, el del WNPRC y el del NIA, fue que los indicadores de salud general mejoraron en los monos con restricción calórica (p. ej., los niveles de glucosa en sangre). Por tanto, sigue siendo posible que la restricción calórica en los seres humanos pueda ayudarnos a llevar una vida más sana y activa en la vejez, incluso si no vivimos más. También es importante recordar que la mayoría de las personas simplemente no mueren por vejez: por lo general algo más nos alcanza primero, como el cáncer o un ataque al corazón. Dado que la obesidad contribuye al desarrollo de muchas enfermedades como la diabetes, las enfermedades cardiacas y el cáncer, podría ser una buena idea para muchos de nosotros restringir nuestra ingesta calórica de todos modos, con independencia de si afecta o no el envejecimiento.

Con independencia de si la restricción calórica será efectiva como una estrategia que aumente la duración de la vida, los estudios que relacionan la ingesta calórica con el envejecimiento nos enseñan que el metabolismo puede afectar directamente nuestras vidas, y se puede modificar con los alimentos que ingerimos.

# Preguntas analíticas



1. ¿Cómo esperaría usted que una caída en el pH afectara una reacción catalizada por la quimotripsina? ¿Cómo podría un aumento en el pH afectar esta reacción?
2. La inhibición de la retroalimentación suele alterar la actividad de la primera enzima de una ruta metabólica en lugar de una de las últimas enzimas de la secuencia. ¿Por qué es esto adaptativo?
3. Después de revisar las reacciones de la formación de glutamina en la página 88, explique por qué cada una de las siguientes afirmaciones es verdadera o falsa con respecto a la tercera (o a la reacción general).
   *a*) Si la reacción se escribiera en reversa, su $\Delta G°'$ sería 3.9 kcal/mol.
   *b*) Si todos los reaccionantes y productos estuvieran en condiciones estándar al comienzo del experimento, tras un periodo la relación [$NH_3$]/[ADP] se reducirá.
   *c*) A medida que la reacción avanza, el $\Delta G°'$ se acerca a cero.
   *d*) En equilibrio, las reacciones directa e inversa son iguales y la relación [ATP]/[ADP] se convierte en la unidad.
   *e*) Es posible que en la célula se forme glutamina cuando la relación [glutamina]/[ácido glutámico] es mayor que uno.
4. Usted acaba de aislar una nueva enzima y ha determinado la velocidad de reacción en tres concentraciones de sustrato diferentes. Encuentra que la pendiente de la curva producto *versus* tiempo es la misma para las tres concentraciones. ¿Qué puede concluir sobre las condiciones en la mezcla de reacción? ¿Cree que la velocidad cambiará si se modifica la concentración de la enzima en lugar de cambiar la concentración del sustrato?
5. La lisozima es una enzima de acción lenta, que requiere aproximadamente dos segundos para catalizar una sola reacción. ¿Cuál es el número de recambio de la lisozima?
6. En la reacción S $\rightleftharpoons$ P, si un mol de producto (P) tiene la misma energía libre que un mol de sustrato (S), ¿cuál es el valor para la $K'_{eq}$ de esta reacción? ¿Cuál es el valor de $\Delta G°'$? Si se comenzó con una solución 1 M de S, ¿reaccionaría espontáneamente para dar algún P? ¿Cuáles serían las concentraciones de S y P cuando la reacción haya alcanzado el equilibrio? (Véase **video tutorial cuantitativo**).
7. ¿Qué se entiende, en términos de cocientes de concentración, cuando se dice que el $\Delta G$ de la hidrólisis del ATP en la célula es de aproximadamente –12 kcal/mol, mientras que el $\Delta G°'$ es de –7.3 kcal/mol?
8. Las enzimas bajo regulación celular son aquellas cuyas reacciones proceden por lo general en condiciones de no equilibrio. ¿Cuál sería el efecto de la inhibición alostérica de una enzima que operaba cerca del equilibrio?
9. En la reacción A $\rightleftharpoons$ B , si la $K_{eq}$ es $10^3$, ¿cuál es el $\Delta G°'$? ¿Cuál es el $\Delta°'$ si la $K_{eq}$ hubiera sido determinada como $10^3$? ¿Cuál es la $K_{eq}$ de la reacción de hexoquinasa indicada en la figura 3-24 (paso 1)? (Véase **video tutorial cuantitativo**).
10. Considere dos reacciones donde el $\Delta G°'$ para la primera reacción es –1 kcal/mol y para la segunda es –4 kcal/mol. Bajo condiciones estándar, ambas reacciones proceden espontáneamente hacia la formación de productos que indican que su $\Delta G°'$ debe ser negativo. ¿La $K'_{eq}$ para la segunda reacción es mayor o menor que la $K'_{eq}$ para la primera? ¿Por cuánto?
11. Si la reacción XA + Y $\rightleftharpoons$ XY + A tiene un $\Delta G°'$ de +7.3 kcal/mol, ¿podría esta reacción ser impulsada en la célula al acoplarla a la hidrólisis del ATP? ¿Por qué, o por qué no?
12. Supongamos que dos proteínas –A y B– pueden asociarse entre sí para formar un complejo. Se mide la constante de disociación a varias temperaturas diferentes y se descubre que a medida que la muestra se calienta la $K_d$ disminuye. ¿Significa esto que la unión de A y B se vuelve más favorable, o menos favorable, a medida que aumenta la temperatura?
13. La reacción del compuesto X con el compuesto Y para producir el compuesto Z es una reacción desfavorable ($\Delta G°'$ = +5 kcal/mol). Dibuje las reacciones químicas que ocurrirían si se utilizara el ATP para dirigir la reacción.
14. El ATP ha evolucionado como la molécula central en el metabolismo energético. ¿Podría el 1,3-bisfosfoglicerato cumplir la misma función? ¿Por qué, o por qué no?
15. Calcule el $\Delta G°'$ para la hidrólisis de ATP en una célula en la que la relación [ATP]/[ADP] ha subido a 100:1 mientras que la concentración de $P_i$ permanece en 10 mM. ¿Cómo se compara esto con la relación de [ATP]/[ADP] cuando la reacción está en equilibrio y la concentración de $P_i$ permanece en 10 mM? ¿Cuál sería el valor para $\Delta G°'$ cuando los reaccionantes y los productos estaban todos en condiciones estándar (1 M)?
16. Considere la reacción:

$$\text{Glucosa} + P_i \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato} + H_2O$$

$$\Delta G°' = +3 \text{ kcal/mol}$$

¿Cuál es la constante de equilibrio, $K'_{eq}$, para esta reacción? (*Nota:* se ignora la concentración de agua). ¿El $\Delta G°'$ positivo en la reacción anterior significa que la reacción nunca puede ir espontáneamente de izquierda a derecha?

17. En condiciones fisiológicas, [glucosa] = 5 mM, [glucosa 6-fosfato] = 83 mM y [$P_i$] = 1 mM. Bajo estas condiciones, ¿la reacción del problema 16 irá espontáneamente de izquierda a derecha? Si no, ¿cuál sería la concentración de glucosa para que la reacción vaya de izquierda a derecha, si las concentraciones de los otros reaccionantes y productos son las indicadas anteriormente?
18. Considere la reacción:

$$\text{Glutamato} + \text{amoniaco} \rightleftharpoons \text{glutamina} + H_2O$$

$$\Delta G°' = +3.4 \text{ kcal/mol}$$

Si la concentración de amoniaco ($NH_3$) es 10 mM, ¿cuál es la relación de glutamato/glutamina requerida para que la reacción proceda espontáneamente de izquierda a derecha a los 25 °C? (Véase **video tutorial cuantitativo**).

19. Debe quedar claro que la síntesis de glutamina no puede ocurrir en una célula mediante la reacción descrita en el problema 18. La reacción real acopla la síntesis de glutamina a la hidrólisis de ATP:

$$\text{glutamato} + \text{amoniaco} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{glutamina} + \text{ADP} + P_i$$

¿Cuál es el $\Delta G°'$ para esta reacción? Supongamos que todos los reaccionantes y productos, excepto el amoniaco, están presentes a 10 mM. ¿Qué concentración de amoniaco se requeriría para hacer avanzar la reacción a la derecha; es decir, para impulsar la síntesis neta de glutamina?

20. Un inhibidor no competitivo no impide que la enzima se una a su sustrato. ¿Cuál será el efecto de aumentar la concentración de sustrato en presencia de un inhibidor no competitivo? ¿Espera que un inhibidor no competitivo afecte $V_{máx}$ de la enzima? $K_M$? Explique brevemente.

CAPÍTULO 4

# Estructura y función de la membrana plasmática



FUENTE: © Peter Turnley / Corbis Images.

## GAS NERVIOSO

El 20 de marzo de 1995 durante la hora pico de la mañana en el sistema del metro de Tokio, uno de los más activos del mundo, un culto religioso lanzó al aire una sustancia química llamada sarín. El ataque fue coordinado entre varias estaciones de metro, y en poco tiempo miles de personas encontraban dificultades para respirar. Aunque solo ocho personas murieron en el ataque, cientos resultaron gravemente heridas. El sarín es un tipo de **gas nervioso** —un arma química producida por los nazis— diseñada para interferir con el sistema nervioso. Tras la Segunda Guerra Mundial tanto Estados Unidos como la Unión Soviética produjeron enormes cantidades de sarín y otros gases nerviosos, y aunque estas armas no se usaron a escala global, las fuerzas armadas iraquíes utilizaron el gas nervioso en un ataque contra la ciudad kurda de Halabja en 1988, así como en la guerra entre Irán e Irak. La molécula de sarín es pequeña pero mortal; funciona mediante el envenenamiento de una enzima que degrada las señales químicas usadas por los nervios para activar las células musculares. Las víctimas de sarín mueren porque los músculos utilizados para respirar se paralizan. En este capítulo aprenderemos cómo las proteínas en la membrana celular convierten las señales químicas en las señales eléctricas que se requieren para muchas actividades fisiológicas.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


4.1 Introducción a la membrana plasmática
4.2 Composición lipídica de las membranas
4.3 Carbohidratos de membrana
4.4 Proteínas de membrana
4.5 Estudio de la estructura y propiedades de las proteínas integrales de membrana
4.6 Lípidos de membrana y fluidez de la membrana
4.7 Naturaleza dinámica de la membrana plasmática
4.8 El glóbulo rojo: un ejemplo de estructura de membrana plasmática
4.9 Movimiento de solutos a través de las membranas celulares
4.10 Difusión a través de la bicapa lipídica
4.11 La difusión de iones a través de membranas
4.12 **VÍAS EXPERIMENTALES:** El receptor acetilcolina
4.13 Difusión facilitada
4.14 Transporte activo
4.15 **PERSPECTIVA HUMANA:** Defectos en los canales iónicos y transportadores como causa de enfermedades hereditarias
4.16 Potenciales de membrana
4.17 Propagación de los potenciales de acción como impulso
4.18 Neurotransmisión: el salto de la hendidura sináptica

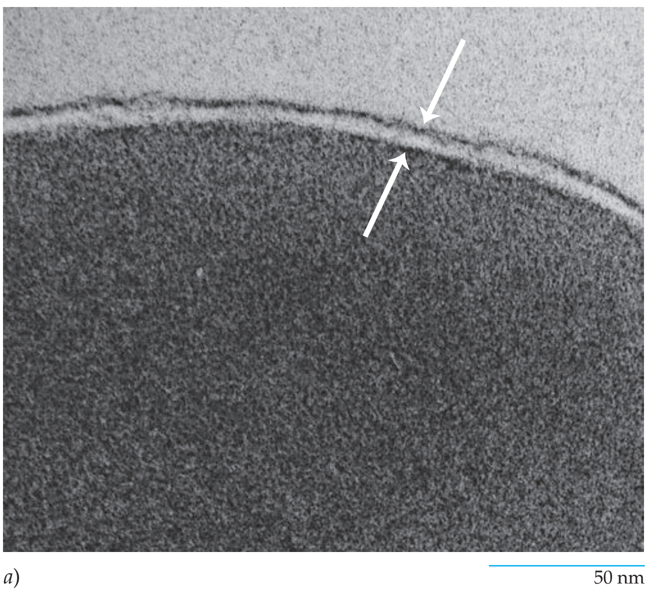
## 4.1 Introducción a la membrana plasmática

Las paredes exteriores de una casa o un automóvil proporcionan una barrera fuerte e inflexible que protege a sus habitantes de un mundo externo rudo e impredecible. Es de esperar que el límite exterior de una célula viva se construya con una barrera igualmente resistente e impenetrable, ya que también debe proteger sus delicados contenidos internos de un entorno no vivo, y con frecuencia inhóspito. Sin embargo, las células están separadas del mundo externo por una estructura delgada y frágil llamada **membrana plasmática** o membrana celular, de solo 5 a 10 nm de ancho. Se necesitarían alrededor de 5 000 membranas apiladas una encima de la otra para igualar el grosor de una sola página de este libro.

Debido a que es tan delgada, no se detecta ningún indicio de la membrana plasmática cuando se examina la sección de una célula bajo un microscopio óptico. De hecho, no fue sino hasta finales de la década de 1950 que las técnicas para preparar y teñir tejidos progresaron hasta el punto en que la membrana plasmática se pudo estudiar al detalle en el microscopio electrónico. Estas primeras micrografías electrónicas, como las tomadas por J. D. Robertson de la Universidad de Duke (véase **FIGURA 4-1*a***), retrataban la membrana plasmática como una estructura de dos capas oscuras, interior y exterior, y una capa media ligeramente teñida. Todas las membranas que se examinaron de cerca —ya fueran plasmáticas, nucleares o de citoplasma (consúltese figura 4-1*b*)— o tomadas de plantas, animales o microorganismos, mostraron esta misma ultraestructura. Además de proporcionar una imagen visual de esta estructura celular de importancia crítica, estas micrografías electrónicas desencadenaron un debate vigoroso sobre la composición molecular de las diversas capas de una membrana, un argumento que fue al corazón del tema de la estructura de la membrana y su función. Como se verá en breve, las membranas celulares contienen una bicapa de lípidos, y las dos capas de tinción oscura en las micrografías electrónicas de la figura 4-1 corresponden principalmente a las superficies polares interna y externa de la bicapa. Volveremos a la estructura de las membranas a continuación, pero primero examinaremos algunas de las principales funciones de las membranas en la vida de una célula (véase **FIGURA 4-2**).

### Descripción general de las funciones de la membrana

1. ***Compartimentación.*** Las membranas son láminas continuas e ininterrumpidas y, como tales, inevitablemente encierran compartimientos. La membrana plasmática encierra el contenido de la célula completa, mientras que las membranas nucleares y citoplásmicas encierran diversos espacios intracelulares. Los diversos compartimientos de una célula unidos a la membrana poseen contenidos marcadamente diferentes. La compartimentación de la membrana permite que las actividades especializadas continúen sin interferencia externa, y permite la regulación independiente de las actividades celulares.
2. ***Plataforma para actividades bioquímicas.*** Las membranas no solo encierran compartimientos, sino que ellas mismas son también un compartimiento diferente. Para los reactivos que flotan libremente en disolución, las interacciones dependen de colisiones aleatorias. Por el contrario, los componentes que están incrustados en una membrana ya no flotan libremente, y se pueden ordenar para una interacción efectiva.
3. ***Proporcionar una barrera permeable selectiva.*** Las membranas evitan el intercambio irrestricto de moléculas de un lado a otro. Al mismo tiempo, las membranas proporcionan los medios de comunicación entre los compartimientos que separan. La membrana plasmática que rodea a una célula se puede comparar con un foso alrededor de un castillo: ambos sirven como una barrera general, pero ambos tienen "puentes" con compuertas que promueven el movimiento de elementos selectos dentro y fuera del espacio vital encerrado.




*a*)

**FIGURA 4-1 Apariencia trilaminar de las membranas.** *a*) Microfotografía electrónica que muestra la estructura de tres capas (trilaminar) de la membrana plasmática de un eritrocito después de teñir el tejido con el metal pesado osmio. El osmio se une preferentemente a los grupos cabeza polar de la bicapa lipídica, produciendo el patrón trilaminar. Las flechas denotan los bordes interno y externo de la membrana. *b*) El borde externo de una célula muscular diferenciada crecida en un cultivo muestra la estructura trilaminar similar, tanto de la membrana plasmática (PM, *plasma membrane*) como de la membrana del retículo sarcoplásmico (SR, *sarcoplasmic reticulum*), un compartimiento que almacena calcio del citoplasma.

FUENTE: *a*) Cortesía de J D Robertson; *b*) De Andrew R Marks, *et al*. *J Cell Biol* 1991;114:305. Reproducida con permiso de la Rockefeller University Press.




*b*)

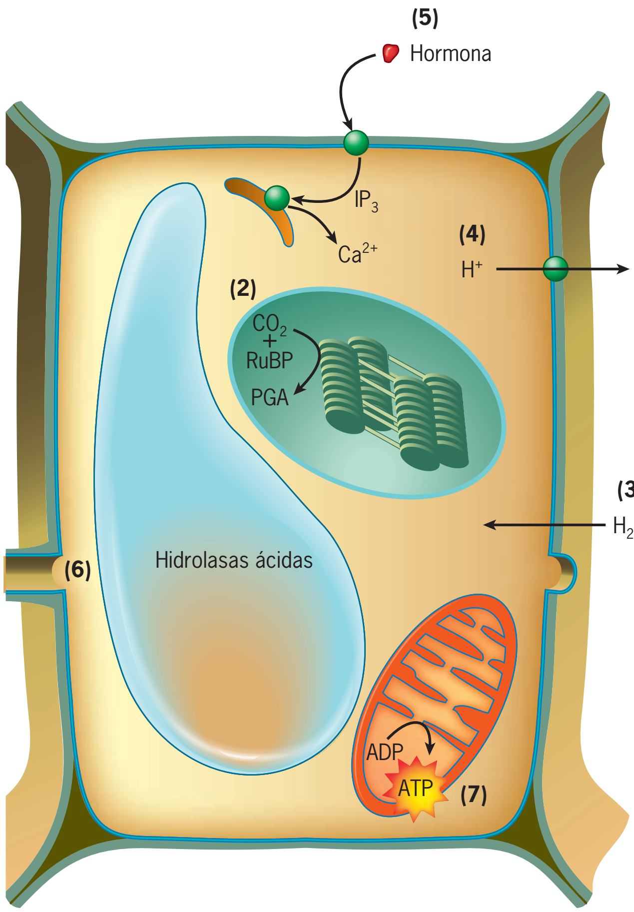



**FIGURA 4-2 Un resumen de las funciones de membrana en una célula vegetal.** 1) Ejemplo de compartimentación de la membrana en el que las enzimas hidrolíticas (hidrolasas ácidas) son secuestradas dentro de la vacuola limitada por la membrana. 2) Ejemplo del papel de las membranas citoplasmáticas como un sitio de localización de enzimas. Una enzima que está asociada con la superficie externa de las membranas tilacoides de los cloroplastos cataliza la fijación de $CO_2$ por la célula de la planta. 3) Ejemplo del papel de las membranas como barrera selectivamente permeable. Las moléculas de agua pueden penetrar rápidamente a través de la membrana plasmática, lo que hace que la célula de la planta llene el espacio disponible y ejerza presión sobre su pared celular. 4) Ejemplo de transporte de solutos. Los iones de hidrógeno, que se producen mediante diversos procesos metabólicos en el citoplasma, se bombean desde las células vegetales al espacio extracelular mediante una proteína de transporte ubicada en la membrana plasmática. 5) Ejemplo de la participación de una membrana en la transferencia de información de un lado a otro (transducción de señales). En este caso, una hormona —por ejemplo, ácido abscísico— se une a la superficie externa de la membrana plasmática y desencadena la liberación de un mensaje químico en el citoplasma (como el inositol trifosfato, IP3). En este caso el IP3 induce la liberación de iones $Ca^{2+}$ desde un almacén citoplásmico. 6) Ejemplo de la función de las membranas en la comunicación célula-célula. Las aberturas entre las células vegetales adyacentes, llamadas plasmodesmos, permiten que los materiales se muevan directamente del citoplasma de una célula a sus vecinos. 7) Ejemplo del papel de las membranas en la transducción de energía. La conversión de difosfato de adenosina (ADP, *adenosine diphosphate*) a trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*) se produce en estrecha asociación con la membrana interna de la mitocondria.

4. ***Transporte de solutos.*** La membrana plasmática contiene la maquinaria para transportar físicamente sustancias desde un lado a otro de ella, a menudo desde una región donde el soluto se envía a baja concentración a una región donde ese soluto está presente a una concentración mucho mayor. La maquinaria de transporte de la membrana permite que una célula acumule sustancias como azúcares y aminoácidos, necesarias para alimentar su metabolismo y construir sus macromoléculas. La membrana plasmática también puede transportar iones específicos, estableciendo así gradientes iónicos a través de sí misma. Esta capacidad es especialmente crítica para las células nerviosas y musculares.
5. ***Respuesta a estímulos externos.*** La membrana plasmática desempeña un papel crítico en la respuesta de una célula a estímulos externos, un proceso conocido como **transducción de señales**. Las membranas poseen **receptores** que se combinan con moléculas específicas (**ligandos**) o responden a otros tipos de estímulos, como la luz o la tensión mecánica. Diferentes tipos de células tienen membranas con diferentes receptores, y por tanto son capaces de reconocer y responder a diferentes estímulos ambientales. La interacción de un receptor de membrana plasmática con un estímulo externo puede provocar que la membrana genere una señal que estimule o inhiba las actividades internas. Por ejemplo, las señales generadas en la membrana plasmática pueden decirle a una célula que fabrique más glucógeno, se prepare para la división celular, se mueva hacia una concentración mayor de un compuesto particular, libere calcio de las reservas internas, o posiblemente que se suicide.
6. ***Interacción intercelular.*** Situada en el borde exterior de cada célula viva, la membrana plasmática de los organismos multicelulares media las interacciones entre una célula y sus vecinos. La membrana plasmática permite a las células reconocerse y señalizarse entre sí, adherirse cuando sea apropiado, e intercambiar materiales e información. Las proteínas dentro de la membrana plasmática también pueden facilitar la interacción entre los materiales extracelulares y el citoesqueleto intracelular.
7. ***Transformación de energía.*** Las membranas están íntimamente involucradas en los procesos mediante los cuales un tipo de energía se convierte en otro (transformación de energía). La transformación de energía más básica ocurre durante la fotosíntesis, cuando los pigmentos unidos a la membrana absorben la energía de la luz solar, esta se convierte en energía química y se almacena en los carbohidratos. Las membranas también están involucradas en la transferencia de energía química de carbohidratos y grasas al ATP. En las eucariotas, la maquinaria para estas conversiones de energía está contenida en las membranas de cloroplastos y mitocondrias.

En este capítulo nos concentraremos en la estructura y las funciones de la membrana plasmática, pero hay que recordar que los principios discutidos aquí son comunes a todas las membranas celulares. Los aspectos especializados de la estructura y funciones de las membranas mitocondriales, cloroplastos, citoplasmáticas, y nucleares, se analizarán en los capítulos 5, 6, 8 y 12, respectivamente.

## Breve historia de los estudios sobre la estructura de la membrana plasmática

Las primeras ideas sobre la naturaleza química de la capa límite externa de una célula fueron obtenidas por Ernst Overton, de la Universidad de Zürich, durante la década de 1890. Overton sabía que los solutos no polares se disolvían más fácilmente en disolventes no polares que en disolventes polares, y que los solutos polares tenían una solubilidad opuesta. Overton razonó que una sustancia que ingresa a una célula desde el medio externo tendría que disolverse primero en la capa límite externa de esa célula. Para probar la permeabilidad de la capa límite externa, Overton colocó pelos de raíz de plantas en cientos de soluciones diferentes que contenían una gran variedad de solutos. Descubrió que cuanto más lipidosoluble era el soluto, más rápido entraría en las células de los pelos radiculares. Llegó a la conclusión de que el poder de disolución de la capa límite externa de la célula era igual al de un aceite graso.

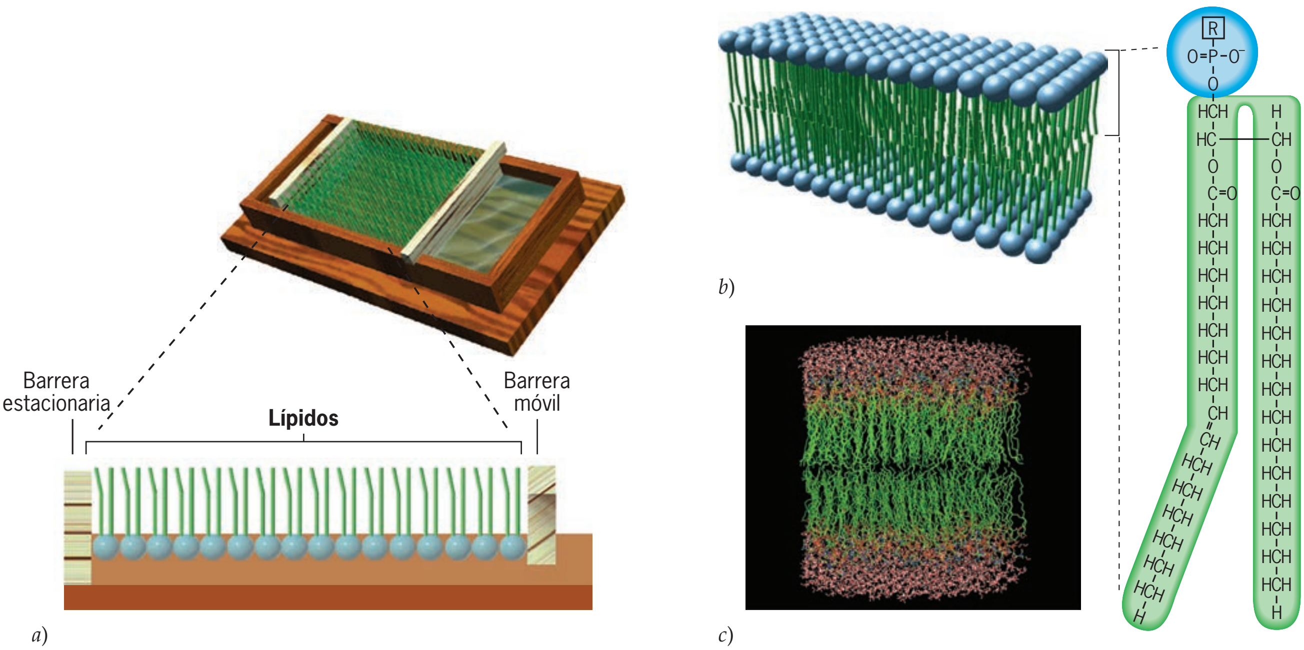



**FIGURA 4-3 La membrana plasmática contiene una bicapa lipídica.** *a*) Cálculo del área de superficie de una preparación de lípidos. Cuando una muestra de fosfolípidos se disuelve en un disolvente orgánico como el hexano y se extiende sobre una superficie acuosa, las moléculas de fosfolípidos forman una capa sobre el agua que tiene una sola molécula de espesor: una capa monomolecular. Las moléculas en la capa están orientadas con sus grupos hidrofílicos unidos a la superficie del agua, y sus cadenas hidrofóbicas dirigidas al aire. Para estimar el área superficial que cubrirían los lípidos si fueran parte de una membrana, las moléculas de lípidos se pueden comprimir en el área más pequeña posible mediante barreras móviles. Utilizando este tipo de aparato, que se llama pesebre de Langmuir por su inventor, Gorter y Grendel concluyeron que los glóbulos rojos contenían suficiente lípido para formar una capa sobre su superficie que tenía dos moléculas de grosor: una bicapa. *b*) Como Gorter y Grendel propusieron por primera vez, el núcleo de una membrana contiene una capa bimolecular de fosfolípidos orientados con sus grupos cabeza solubles en agua que miran hacia las superficies externas, y sus colas de ácidos grasos hidrófobos que miran hacia el interior. Las estructuras de los grupos cabeza se muestran en la figura 4-6*a*).
*c*) Simulación de una bicapa de lípidos completamente hidratada compuesta del fosfolípido fosfatidilcolina. Los grupos cabeza de fosfolípidos son morados, las moléculas de agua son azules, las cadenas de ácidos grasos son verdes.

FUENTE: *c*) Simulación de una bicapa lipídica completamente hidratada. Los grupos cabeza de fosfolípidos se muestran en azul y naranja, las moléculas de agua en rojo y blanco, y las cadenas de ácido graso son verdes.

La primera propuesta de que las membranas celulares podrían contener una bicapa lipídica fue realizada en 1925 por dos científicos holandeses, E. Gorter y F. Grendel. Estos investigadores extrajeron los lípidos de los glóbulos rojos humanos, y midieron la cantidad de área superficial que cubrían los lípidos cuando se extendían sobre la superficie del agua (consúltese **FIGURA 4-3*a***). Como los glóbulos rojos de mamíferos maduros carecen tanto de núcleos como de organelos citoplásmicos, la membrana plasmática es la única estructura que contiene lípidos en la célula. En consecuencia, se podía suponer que todos los lípidos extraídos de las células residían en las membranas plasmáticas de las células. La relación entre el área superficial de agua cubierta por el lípido extraído, y el área superficial calculada para los glóbulos rojos de los que se extrajo el lípido varió de 1.8 a 1 y de 2.2 a 1. Gorter y Grendel especularon que la proporción real era 2:1 y concluyeron que la membrana plasmática contenía una capa bimolecular de lípidos, es decir, una **bicapa lipídica** (obsérvese figura 4-3*b*). También sugirieron que los grupos polares de cada capa (u *hoja*) individual se dirigían hacia afuera, hacia el entorno acuoso, como se muestra en la figura 4-3*b*), *c*). Esta sería la disposición termodinámicamente preferida, porque los grupos de cabeza polar de los lípidos podrían interactuar con las moléculas de agua circundantes, del mismo modo que las cadenas de acilo graso hidrofóbicas estarían protegidas del contacto con el medio acuoso (véase figura 4-3*c*). De aquí que los grupos de cabeza polar se enfrentarían al citoplasma en un borde, y al plasma sanguíneo en el otro. A pesar de que Gorter y Grendel cometieron varios errores experimentales (que fortuitamente se cancelaron entre sí), llegaron a la conclusión correcta de que las membranas contienen una bicapa lipídica.

En los años 1920 y 1930 los fisiólogos celulares obtuvieron evidencias de que debe haber más en la estructura de las membranas que simplemente una bicapa lipídica. Se encontró, por ejemplo, que la solubilidad de los lípidos no era el único factor para determinar si una sustancia podía penetrar en la membrana plasmática. De manera similar se calculó que las tensiones superficiales de las membranas son mucho más bajas que las de las estructuras lipídicas puras. Esta disminución en la tensión superficial podría explicarse por la presencia de proteínas en la membrana.

Estas proteínas están presentes en forma de moléculas individuales de proteína, y complejos proteicos que penetran en una bicapa lipídica fluida (véase **FIGURA 4-4*a***), y se extienden hacia el entorno acuoso circundante (véase figura 4-4*b*). Debido a la fluidez de los lípidos, las membranas celulares de la capa son estructuras dinámicas en las que los componentes son móviles, y capaces de unirse para participar en diversos tipos de interacciones transitorias o semipermanentes.

## REPASO

1. Describa algunas de las tareas importantes de las membranas en la vida de una célula eucariótica. ¿Cuál cree usted que podría ser el efecto de una membrana incapaz de realizar una u otra de estas funciones?
2. Resuma algunos de los principales pasos que conducen al modelo actual de la estructura de la membrana. ¿Cómo conserva cada nuevo modelo ciertos principios básicos de los modelos anteriores?

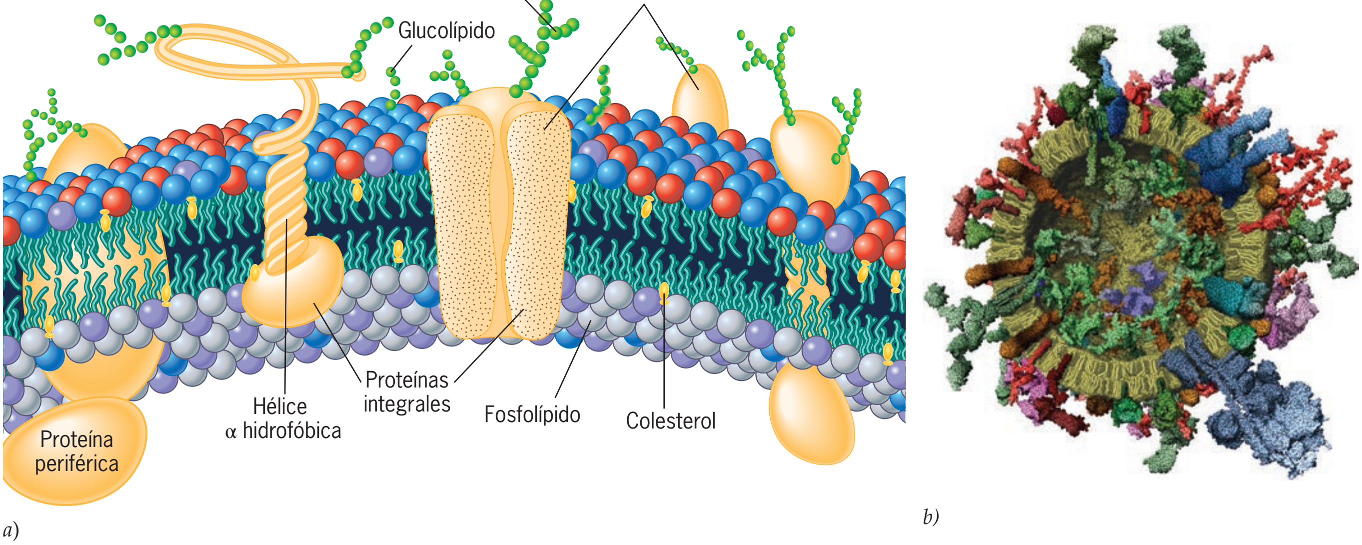



**FIGURA 4-4 La membrana plasmática como lípidos más proteínas.** *a*) Representación de la membrana plasmática que muestra la organización de las proteínas incrustadas en la bicapa lipídica. La superficie externa de la mayoría de las proteínas de membrana, así como un pequeño porcentaje de los fosfolípidos, contienen cadenas cortas de azúcares, lo que las convierte en glucoproteínas y glucolípidos. Esas porciones de las cadenas polipeptídicas que se extienden a través de la bicapa lipídica suelen producirse como hélices α compuestas de aminoácidos hidrófobos. Las dos hojas de la bicapa contienen diferentes tipos de lípidos, según lo indicado por los grupos cabeza de diferentes colores. *b*) Modelo molecular de la membrana de una vesícula sináptica construida con estructuras conocidas de varias proteínas, junto con información sobre sus números relativos obtenidos a partir del análisis de vesículas sinápticas purificadas. Es evidente la alta densidad proteica de la membrana. La mayoría de las proteínas en esta membrana son necesarias para la interacción de la vesícula con la membrana plasmática. La gran proteína azul en la parte inferior derecha bombea iones $H^+$ hacia la vesícula.

FUENTE: *b*) De Shigeo Takamori, *et al*. Cortesía de Reinhard Jahn, *Cell* 2006;127:841, reimpreso con permiso de Elsevier.

## 4.2 Composición lipídica de las membranas

Las membranas son ensambles de lípidos y proteínas en las que los componentes se mantienen unidos en una lámina delgada mediante enlaces no covalentes. Como se observa en la página 117, el núcleo de la membrana consiste en una lámina de lípidos dispuesta en una capa bimolecular (véase figura 4-3*b*), *c*). La bicapa lipídica sirve principalmente como columna estructural de la membrana, y proporciona una barrera que evita los movimientos aleatorios de los materiales solubles en agua hacia dentro y fuera de la célula. Las proteínas de la membrana, por otro lado, llevan a cabo la mayoría de las funciones específicas resumidas en la figura 4-2. Cada tipo de célula diferenciada contiene un complemento único de proteínas de membrana, que contribuye a las actividades especializadas de ese tipo de célula [véase figura 4-32*d*) para un ejemplo].

La relación de lípido a proteína en una membrana varía, en dependencia del tipo de membrana celular (plasma *vs*. retículo endoplasmático *vs*. Golgi), el tipo de organismo (bacteria *vs*. planta *vs*. animal) y el tipo de célula (cartílago) *vs*. músculo *vs*. hígado). Por ejemplo, la membrana mitocondrial interna tiene una proporción muy alta de proteína/lípido en comparación con la membrana plasmática de glóbulos rojos, que es alta en comparación con las membranas de la vaina de mielina que forma una envoltura de múltiples capas alrededor de una célula nerviosa (véase **FIGURA 4-5**). En gran medida, estas diferencias se pueden correlacionar con las funciones básicas de estas membranas. La membrana mitocondrial interna contiene los portadores de proteína de la cadena de transporte de electrones, y en relación con otras membranas los lípidos disminuyen. En contraste, la vaina de mielina actúa principalmente como aislamiento eléctrico para la célula nerviosa que encierra, una función que se lleva a cabo mejor mediante una capa lipídica espesa de alta resistencia eléctrica, con un contenido mínimo de proteína. Las membranas también contienen carbohidratos, que están unidos a los lípidos y las proteínas como se indica en la figura 4-4*a*).

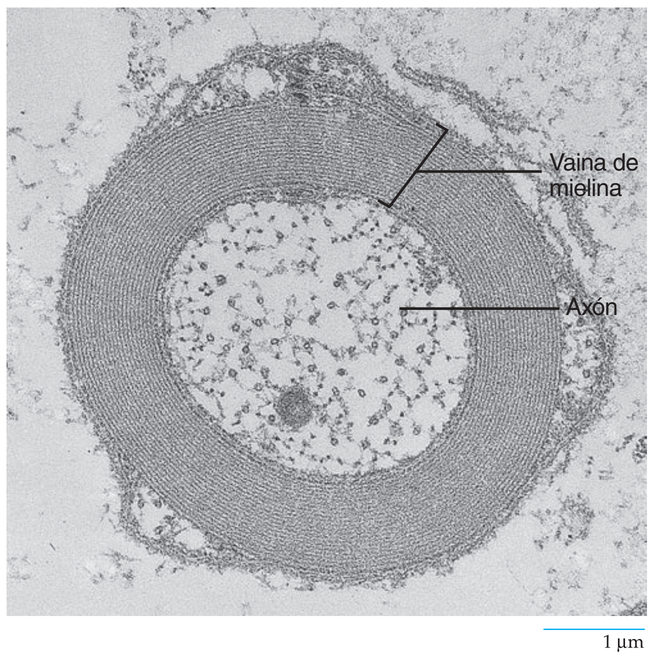



**FIGURA 4-5 Vaina de mielina.** Microfotografía electrónica de un axón de células nerviosas rodeado por una vaina de mielina, que consiste en capas concéntricas de membrana plasmática con una relación proteína/lípido extremadamente baja. La vaina de mielina aísla la célula nerviosa del entorno circundante, lo que aumenta la velocidad a la que pueden viajar los impulsos a lo largo del axón (se trata en la página 162). El espacio perfecto entre las capas se mantiene mediante moléculas de proteínas entrelazadas (llamadas P0) que se proyectan desde cada membrana.

FUENTE: De Leonard Napolitano, Francis LeBaron y Jospeh Scaletti. *J Cell Biol* 1967;34:820. Reproducida con permiso de la Rockefeller University Press.

## Lípidos de membrana

Las membranas contienen una gran diversidad de lípidos, todos ellos **anfipáticos**; es decir, contienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas. Existen tres tipos principales de lípidos de membrana: fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol.

**FOSFOGLICÉRIDOS** La mayoría de los lípidos de la membrana contienen un grupo fosfato, que los convierte en **fosfolípidos**. Debido a que la mayor parte de los fosfolípidos de membrana se basan en un esqueleto de glicerol, se denominan **fosfoglicéridos** (consúltese **FIGURA 4-6*a***). A diferencia de los triglicéridos, que tienen tres ácidos grasos (página 46) y no son anfipáticos, los glicéridos de membrana son *diglicéridos*; solo dos de los grupos hidroxilo del glicerol están esterificados a ácidos grasos, el tercero está esterificado a un grupo fosfato hidrófilo. Sin ninguna sustitución adicional más allá del fosfato y las dos cadenas de acilo graso, la molécula se llama *ácido fosfatídico*, que prácticamente no existe en la mayoría de las membranas. En cambio, los fosfoglicéridos de membrana tienen un grupo adicional relacionado con el fosfato, por lo común de colina (que forma *fosfatidilcolina* [PC, *phosphatidylcholine*]), etanolamina (que forma *fosfatidiletanolamina* [PE, *phosphatidylethanolamine*]), serina (que forma *fosfatidilserina* [PS, *phosphatidylserine*]) o inositol (que forma *fosfatidilinositol*, [PI, *phosphatidylinositol*]). Cada uno de estos grupos es pequeño e hidrofílico, y junto con el fosfato cargado negativamente al que está unido forma un dominio altamente soluble en agua en un extremo de la molécula, llamado **grupo cabeza**. En el pH fisiológico, los grupos cabeza de PS y PI tienen una carga negativa general, mientras que los de PC y PE son neutros. Por el contrario, las cadenas de acilo graso son hidrocarburos hidrofóbicos no ramificados de aproximadamente 16 a 22 carbonos de longitud (consúltese figura 4-6*a*). Un ácido graso de membrana puede estar completamente saturado (es decir, no poseer enlaces dobles), ser monoinsaturado (es decir, tener un doble enlace) o ser poliinsaturado (poseer más de un doble enlace). Los fosfoglicéridos a menudo contienen una cadena de ácido graso insaturado y una de ácido graso saturado. Intereses recientes se han centrado en los aparentes beneficios para la salud de dos ácidos grasos altamente insaturados (ácido icosapentaenoico [EPA, *eicosapentaenoic acid*] y ácido docosahexaenoico [DHA, *docosahexaenoic acid*]), que se encuentran en altas concentraciones en el aceite de pescado. El EPA y el DHA contienen cinco y seis dobles enlaces respectivamente, y se incorporan sobre todo en las moléculas de PE y PC de ciertas membranas, en especial en el cerebro y la retina. El EPA y el DHA se describen como ácidos grasos omega-3 debido a que su último doble enlace está situado a tres carbonos del extremo omega ($CH_3$) de la cadena de acilo graso. Con las cadenas de ácidos grasos en un extremo de la molécula y un grupo de cabeza polar en el otro extremo, todos los fosfoglicéridos muestran un definido carácter anfipático.

**ESFINGOLÍPIDOS** Una clase menos abundante de lípidos de membrana llamados **esfingolípidos** se derivan de la esfingosina, un aminoalcohol que contiene una larga cadena de hidrocarburos (véase figura 4-6*b*). Los esfingolípidos consisten en esfingosina unida a un ácido graso por su grupo amino (R en figura 4-6*b*). Esta molécula es una *ceramida*. Los diversos lípidos con base en la esfingosina tienen grupos adicionales esterificados al alcohol terminal del resto esfingosina. Si la sustitución es fosforilcolina, la molécula es *esfingomielina*, único fosfolípido de la membrana que no está construido con una cadena principal de glicerol. Si la sustitución es un hidrato de carbono, la molécula es un *glucolípido*. Si el carbohidrato es un azúcar simple, el glucolípido se llama **cerebrósido**; si se trata de un pequeño grupo de azúcares que incluye ácido siálico, el glucolípido se llama **gangliósido**. Cientos de diferentes gangliósidos han sido identificados por las diferencias en sus cadenas de carbohidratos. Como

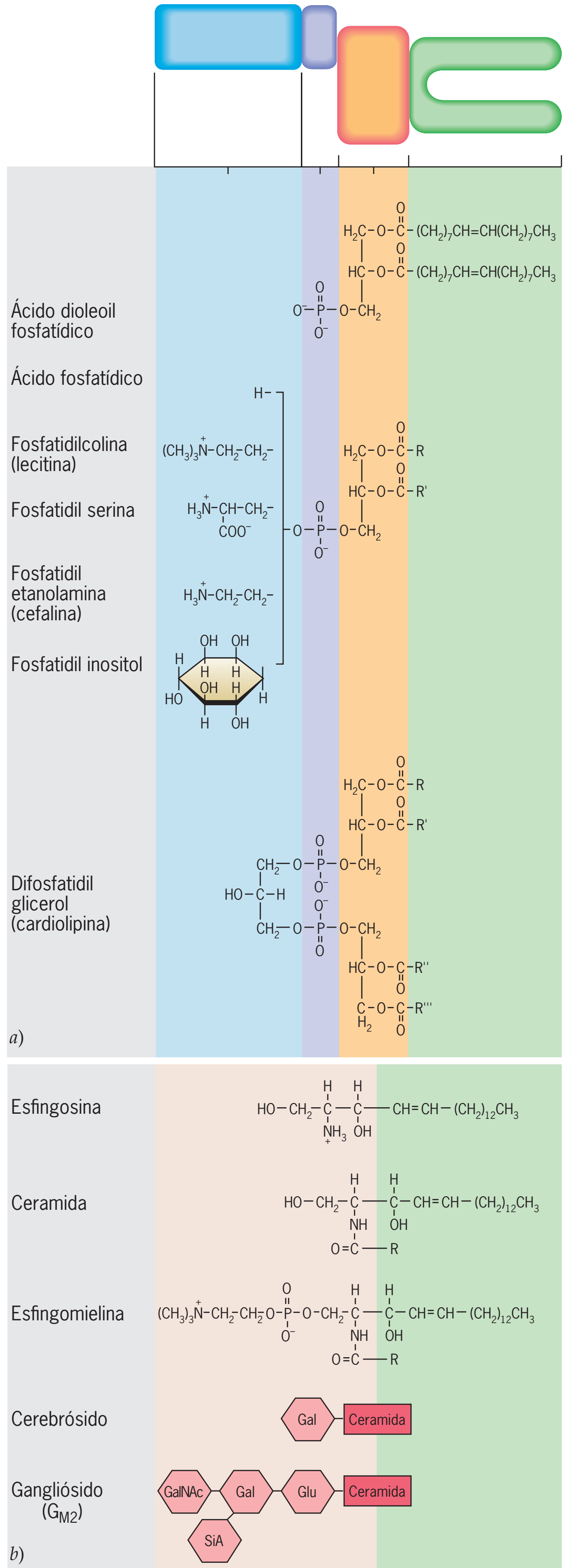



**FIGURA 4-6 Estructura química de los lípidos de la membrana.** *a*) Estructuras de los fosfoglicéridos (véase también figura 2-22). *b*) Estructuras de los esfingolípidos. La esfingomielina es un fosfolípido; los cerebrósidos y los gangliósidos son glucolípidos. Un tercer lípido de membrana es el colesterol, que se muestra en la siguiente figura. (R = cadena de acilo graso). [La porción verde de cada lípido, que representa la(s) cola(s) hidrofóbica(s) de la molécula, es en realidad mucho más larga que el grupo de cabeza hidrofílico (véase figura 4-23)].

todos los esfingolípidos tienen dos largas cadenas de hidrocarburos hidrofóbicas en un extremo y una región hidrofílica en el otro, también son anfipáticos y básicamente similares en estructura general a los fosfoglicéridos. Sin embargo, las cadenas de acilo graso de los esfingolípidos tienden a ser más largas y más altamente saturadas que las de los fosfoglicéridos.



Los glucolípidos son componentes de membrana interesantes. Se sabe relativamente poco acerca de ellos sin embargo, han surgido sugerentes indicios sobre su desempeño crucial en la función celular. El sistema nervioso es particularmente rico en glucolípidos. La vaina de mielina representada en la figura 4-5 contiene un alto contenido de un glucolípido particular, llamado galactocerebrósido (que se muestra en la figura 4-6*b*), que se forma cuando se agrega una galactosa a la ceramida. Los ratones que carecen de la enzima que lleva a cabo esta reacción presentan temblores musculares severos y eventual parálisis. Del mismo modo, los seres humanos que no pueden sintetizar un gangliósido particular ($GM_3$) sufren de una enfermedad neurológica aguda, caracterizada por convulsiones graves y ceguera. Los glucolípidos también desempeñan un papel en ciertas enfermedades infecciosas; las toxinas que causan el cólera y el botulismo ingresan a su célula objetivo uniéndose primero a los ganglios de la superficie celular, como lo hace el virus de la influenza.

**COLESTEROL** Otro componente lipídico de ciertas membranas es el esterol **colesterol** (véase figura 2-21), que en ciertas células animales puede constituir hasta 50% de las moléculas de lípidos en la membrana plasmática. Las células vegetales contienen esteroles similares al colesterol, pero los biólogos no están de acuerdo en si carecen completamente de colesterol. Las moléculas de colesterol están orientadas con su pequeño grupo hidroxilo hidrofílico hacia la superficie de la membrana, y el resto de la molécula incrustada en la bicapa lipídica (consúltese **FIGURA 4-7**). Los anillos hidrofóbicos de una molécula de colesterol son planos y rígidos, e interfieren con los movimientos de las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos (consúltese página 131).

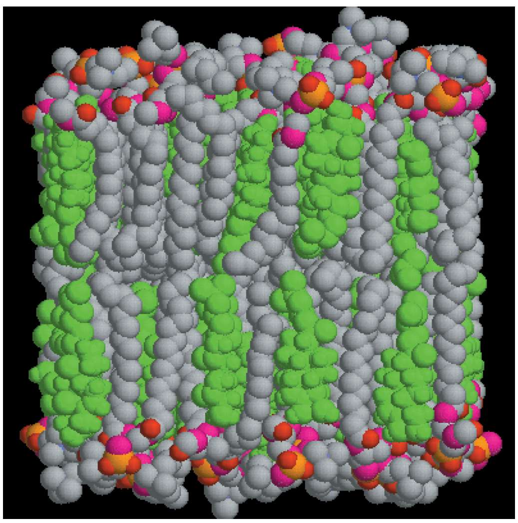


**FIGURA 4-7 Las moléculas de colesterol** (mostradas en verde) de una bicapa lipídica están orientadas con su pequeño extremo hidrofílico dirigido hacia la superficie externa de la bicapa, y el grueso de su estructura está empaquetado entre las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos. La colocación de las moléculas de colesterol interfiere con la flexibilidad de las cadenas de hidrocarburos lipídicos, lo que tiende a endurecer la bicapa mientras mantiene su fluidez general. A diferencia de otros lípidos de la membrana, el colesterol a menudo se distribuye bastante uniformemente entre las dos capas u hojas.

FUENTE: De HL Scott. *Curr Opin Struc Biol* 2002;12:499, figura 3. ©2002, con permiso de Elsevier.

## Naturaleza e importancia de la bicapa lipídica

Cada tipo de membrana celular tiene su propia composición lipídica característica, y se diferencian unas de las otras en los tipos de lípidos, la naturaleza de los grupos cabeza y las especies particulares de la(s) cadena(s) de acilo graso. Por esta variabilidad estructural, se estima que algunas membranas biológicas contienen cientos de especies químicas diferentes de fosfolípidos, que pueden catalogarse mediante espectrometría de masas. La importancia biológica de esta notable diversidad de especies de lípidos sigue siendo objeto de interés y especulación.

En la tabla 4-1 aparecen los porcentajes de algunos de los principales tipos de lípidos de una variedad de membranas. Los lípidos de una membrana son más que simples elementos estructurales; pueden tener importantes efectos sobre las propiedades biológicas de una membrana. La composición lipídica puede determinar el estado físico de la membrana (consúltese página 131), e influir en la actividad de las proteínas de membrana particulares. Los lípidos de membrana también proporcionan los precursores de mensajeros químicos altamente activos que regulan la función celular (consúltese sección 15.6).

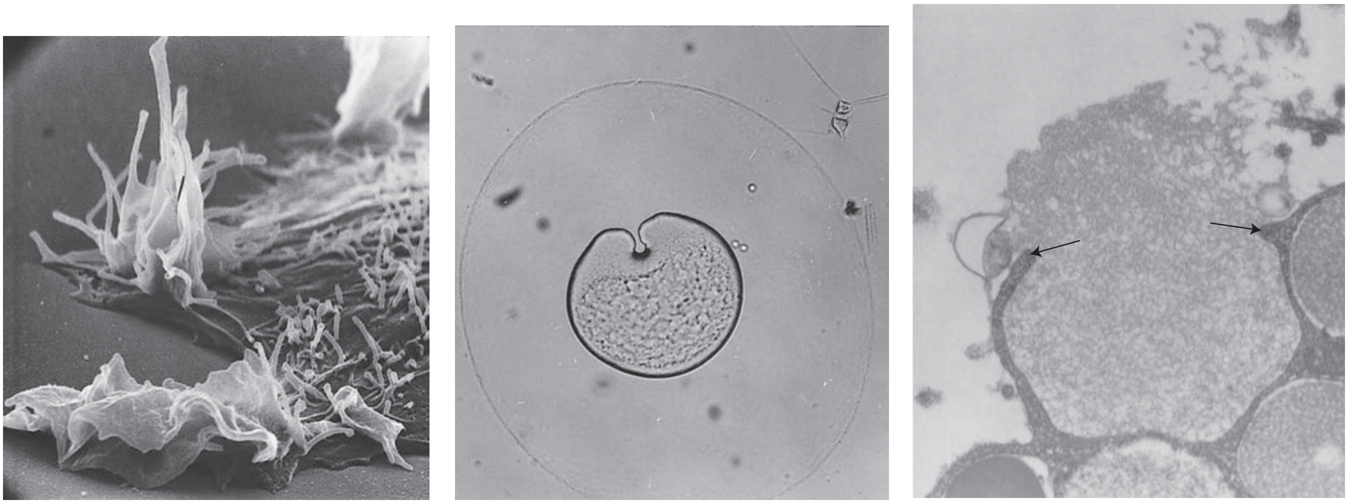
Varios tipos de mediciones indican que las cadenas de acilo graso combinadas de ambas cubiertas de la bicapa lipídica abarcan un ancho de aproximadamente 30 Å, y que cada fila de grupos cabeza (con su corteza adyacente de moléculas de agua) agrega otros 15 Å. Por tanto, toda la bicapa lipídica tiene un espesor de solo 60 Å (6 nm). La presencia en las membranas de esta película delgada de moléculas de lípidos anfipáticos tiene consecuencias notables para la estructura y la función de la célula. Por razones termodinámicas, las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa lipídica nunca se exponen a la solución acuosa circundante. En consecuencia, nunca se ha visto que las membranas tengan un borde libre; ellos son siempre estructuras continuas e ininterrumpidas. Como resultado, las membranas forman redes interconectadas extensas dentro de la célula. Debido a la flexibilidad de la bicapa lipídica, las membranas son deformables y su forma general puede cambiar, como ocurre durante la locomoción (obsérvese **FIGURA 4-8*a***), o la división celular (véase figura 4-8*b*). Se cree que la bicapa lipídica facilita la fusión regulada o la gemación de las membranas. Por ejemplo, los eventos de secreción, en los cuales las vesículas citoplásmicas se fusionan con la membrana plasmática (véase figura 4-8*c*), o de la fertilización, donde dos células se fusionan para formar una sola célula, involucran procesos en los que dos membranas separadas se unen para convertirse en una sola superficie continua (véase figura 8-32). A lo largo de este capítulo, y en los siguientes, se hará evidente la importancia de la bicapa lipídica en el mantenimiento de la composición interna adecuada de una célula, en la separación de cargas eléctricas a través de la membrana plasmática, y en muchas otras actividades celulares.

Otra característica significativa de la bicapa lipídica es su capacidad de autoensamblarse, lo que se puede demostrar con mayor facilidad dentro de un tubo de ensayo que una célula viva. Por ejemplo, si se dispersa una pequeña cantidad de fosfatidilcolina en una solución acuosa, las moléculas de fosfolípidos se ensamblan espontáneamente para formar las paredes de las vesículas esféricas llenas de líquido, llamadas **liposomas**. Las paredes de estos liposomas consisten en una bicapa lipídica continua que se organiza de la misma manera que la de la bicapa lipídica de una membrana natural. Los liposomas han demostrado ser inapreciables en la investigación de membranas. Las proteínas de membrana pueden insertarse en los liposomas, y su función se puede estudiar en un entorno mucho más simple que en el de una membrana natural. Los liposomas también se han desarrollado como vehículos para administrar fármacos o moléculas de DNA dentro del cuerpo. Los fármacos o el DNA se pueden unir a la pared del liposoma, o contener una alta concentración dentro de su lumen

**TABLA 4-1 Composición lipídica de algunas membranas biológicas***

| Lípido | Eritrocito humano | Mielina humana | Mitocondria de corazón bovino | *E. coli* |
|---|---|---|---|---|
| Ácido fosfatídico | 1.5 | 0.5 | 0 | 0 |
| Fosfatidilcolina | 19 | 10 | 39 | 0 |
| Fosfatidil-etanolamina | 18 | 20 | 27 | 65 |
| Fosfatidilglicerol | 0 | 0 | 0 | 18 |
| Fosfatidilserina | 8.5 | 8.5 | 0.5 | 0 |
| Cardiolipina | 0 | 0 | 22.5 | 12 |
| Esfingomielina | 17.5 | 8.5 | 0 | 0 |
| Glucolípidos | 10 | 26 | 0 | 0 |
| Colesterol | 25 | 26 | 3 | 0 |

* Los valores dados son el porcentaje en peso de los lípidos totales.
*Fuente:* C. Tanford. *The Hydrophobic Effect*, p. 109, copyright 1980, John Wiley & Sons, Inc. Reproducida con permiso de John Wiley & Sons, Inc.



*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 4-8 Propiedades dinámicas de la membrana plasmática.** *a*) El borde de ataque de una célula en movimiento a menudo contiene sitios donde la membrana plasmática muestra volantes ondulantes. *b*) La división de una célula va acompañada de la deformación de la membrana plasmática mientras se atrae hacia el centro de la célula. A diferencia de la mayoría de las células en división, el surco de escisión de este huevo ctenóforo en división comienza en un polo y se mueve unidireccionalmente a través del huevo. *c*) Las membranas son capaces de fusionarse con otras membranas. Esta micrografía electrónica muestra un gránulo secretor que descarga su contenido después de la fusión con la membrana plasmática superpuesta (flechas).
FUENTE: *a*) cortesía de Jean Paul Revel; *b*) cortesía de Gary Freeman; *c*) cortesía de Susan Jo Burwen.

(véase figura 4-9). En estos estudios las paredes de los liposomas están construidas para contener proteínas específicas (como anticuerpos u hormonas), que permiten que los liposomas se unan selectivamente a las superficies de la célula blanco particular a la que se destina el fármaco o el DNA. La mayoría de los primeros estudios clínicos con liposomas no dieron frutos, porque las vesículas inyectadas fueron eliminadas rápidamente por las células fagocíticas del sistema inmune. Este obstáculo se ha superado con el desarrollo de los llamados liposomas sigilosos, que contienen un recubrimiento externo de un polímero sintético que protege a los liposomas de la destrucción inmune (consúltese **FIGURA 4-9**). Un ejemplo importante es el Caelyx, un liposoma sigiloso que contiene el fármaco de quimioterapia doxorrubicina. El Caelyx es ahora una terapia aceptada para el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

## Asimetría de los lípidos de la membrana

La bicapa lipídica consiste en dos hojas distintas, que tienen una composición lipídica claramente diferente. Un conjunto de experimentos que ha llevado a esta conclusión aprovecha el hecho de que las enzimas que digieren lípidos no pueden penetrar en la membrana plasmática, y en consecuencia solo pueden digerir lípidos que residen en la capa externa de la bicapa. Si los glóbulos rojos humanos intactos se tratan con una fosfolipasa digestiva de

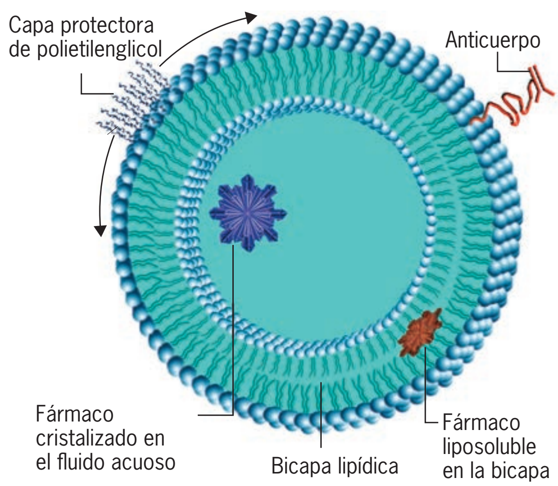



**FIGURA 4-9 Liposomas.** Un diagrama esquemático de un liposoma oculto que contiene un polímero hidrofílico (como polietilenglicol) para protegerlo de la destrucción por las células inmunes; moléculas de anticuerpos que lo dirigen a tejidos corporales específicos; un fármaco soluble en agua encerrado en la cámara interior llena de líquido, y un fármaco liposoluble en la bicapa.

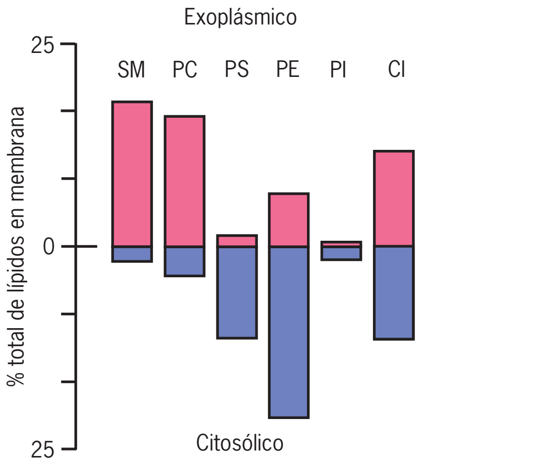



**FIGURA 4-10 Distribución asimétrica de los fosfolípidos (y el colesterol) en la membrana plasmática de los eritrocitos humanos.** (SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PS: fosfatidilserina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, Cl: colesterol).

lípidos, aproximadamente 80% de la fosfatidilcolina (PC) de la membrana se hidroliza, pero solo alrededor de 20% de la fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana y menos de 10% de su fosfatidilserina (PS) son atacados. Estos datos indican que, en comparación con la capa interna, la capa externa tiene una concentración relativamente alta de PC (y esfingomielina) y baja concentración de PE y PS (consúltese **FIGURA 4-10**). De esto se deduce que se puede pensar que la bicapa lipídica está compuesta de dos monocapas independientes más o menos estables, que tienen diferentes propiedades físicas y químicas.

Las diferentes clases de lípidos en la figura 4-10 exhiben propiedades distintas. Todos los glucolípidos de la membrana plasmática se encuentran en la capa externa, donde a menudo sirven como receptores para ligandos extracelulares. La fosfatidiletanolamina, que se concentra en la capa interna, tiende a promover la curvatura de la membrana, lo que es importante en la gemación y la fusión de la membrana. La fosfatidilserina, que se concentra en la capa interna, tiene una carga neta negativa a pH fisiológico, lo que la hace candidata para unirse a residuos de lisina y arginina cargados positivamente, como los adyacentes a la hélice α de membrana de la glucoforina A en la figura 4-18. La aparición de PS en la superficie externa de los linfocitos envejecidos marca las células para que los macrófagos las destruyan, mientras que su aparición en la superficie externa de las plaquetas conduce a la coagulación de la sangre. El fosfatidilinositol (PI), que se concentra en la capa interna, se puede fosforilar en diferentes sitios en el anillo de inositol, que convierte el lípido en un fosfoinosítido. Como se discutió en el capítulo 15, los fosfoinosítidos desempeñan un papel clave en la transferencia de estímulos de la membrana plasmática al citoplasma (consúltese sección 15.6) y en el reclutamiento de proteínas en la cara citosólica de la membrana plasmática.

## REPASO

1. Dibuje la estructura básica de los principales tipos de lípidos que se encuentran en las membranas celulares. ¿Cómo difieren los esfingolípidos de los glicerolípidos? ¿Cuáles lípidos son fosfolípidos? ¿Cuáles son glucolípidos? ¿Cómo se organizan estos lípidos en una bicapa? ¿Qué importancia tiene la bicapa para las actividades de la membrana?
2. ¿Qué es un liposoma? ¿Cómo se usan los liposomas en las terapias médicas?

# 4.3 Carbohidratos de membrana

Las membranas plasmáticas de las células eucariotas también contienen carbohidratos. En dependencia de la especie y del tipo de célula, el contenido de carbohidratos de la membrana plasmática oscila entre 2 y 10% en peso. Más de 90% de los carbohidratos de la membrana se unen en forma covalente a las proteínas para formar glucoproteínas; el carbohidrato restante está ligado en forma covalente a los lípidos para formar glucolípidos, lo cual se discutió en la página 119. Como se indica en la figura 4-4*c*), todos los carbohidratos de la membrana plasmática miran hacia afuera en el espacio extracelular.[1] El carbohidrato de las membranas celulares internas también se orienta hacia fuera del citosol (la base para esta orientación se ilustra en la figura 8-14).

La modificación de proteínas se discutió brevemente en la página 50. La adición de carbohidratos, o **glucosilación**, es la más compleja de estas modificaciones. El carbohidrato de las glucoproteínas está presente como **oligosacáridos** hidrofílicos cortos ramificados, que es usual posean menos de unos 15 azúcares por cadena. A diferencia de la mayoría de los carbohidratos de alto peso molecular (como el glucógeno, almidón o celulosa), que son polímeros de un solo azúcar, los oligosacáridos unidos a las proteínas de membrana y a los lípidos pueden mostrar una gran variabilidad en la composición y estructura. Incluso la misma proteína puede mostrar diferentes cadenas de azúcares en distintas células y tejidos. Los oligosacáridos se pueden unir a varios aminoácidos diferentes mediante dos tipos principales de enlaces (consúltese **FIGURA 4-11**). Estas proyecciones de carbohidratos realizan un papel importante en la mediación de las interacciones de una célula con su entorno (véase capítulo 7), y en la clasificación de proteínas de membrana en diferentes compartimientos celulares (consúltese capítulo 8). Los carbohidratos de los glucolípidos en la membrana plasmática de los glóbulos rojos determinan si el tipo de sangre de una persona es A, B, AB u O (obsérvese **FIGURA 4-12**). Una persona que tiene sangre tipo A tiene una enzima que agrega *N*-acetilgalactosamina al final de la cadena,

[1] Se debe notar que aunque el fosfatidilinositol contiene un grupo de azúcar (véase figura 4-6), en esta discusión no se considera que sea parte de la porción de carbohidrato de la membrana.

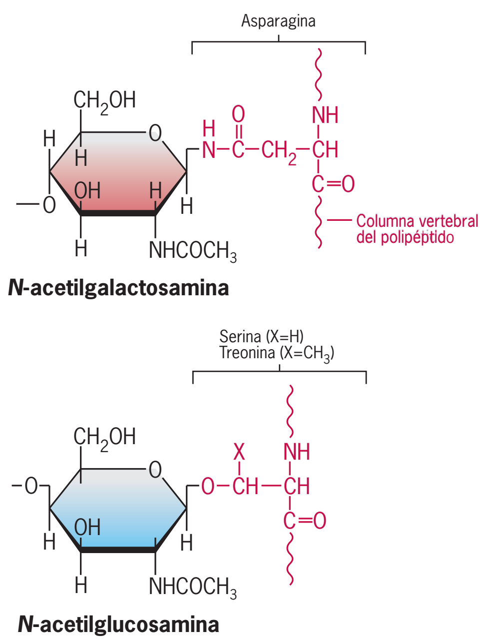



**FIGURA 4-11 Dos tipos de enlaces que unen azúcares a una cadena polipeptídica.** El enlace *N*-glucosídico entre la asparagina y *N*-acetilglucosamina es más común que el enlace *O*-glucosídico entre la serina o treonina y *N*-acetilgalactosamina.

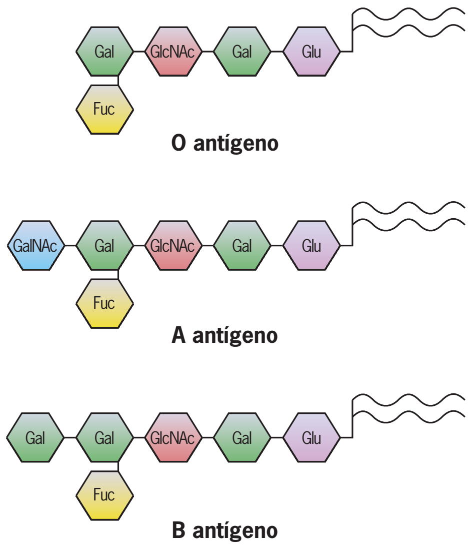



**FIGURA 4-12 Antígenos de los grupos sanguíneos.** Que una persona tenga sangre de tipo A, B, AB u O está determinado por una cadena corta de azúcares unida en forma covalente a lípidos y proteínas de membrana de los glóbulos rojos. Aquí se muestran los oligosacáridos unidos a los lípidos de membrana (que forman un gangliósido) que producen los tipos de sangre A, B y O. Una persona con sangre tipo AB tiene ganglios con las estructuras A y B. (Gal: galactosa; GlcNAc: *N*-acetilglucosamina; Glu: glucosa; Fuc: fucosa; GalNAc: *N*-acetilgalactosamina).

mientras que una persona con sangre tipo B tiene una enzima que añade galactosa al final de la cadena. Versiones alternas del mismo gen codifican estas dos enzimas, aunque ellas reconocen sustratos diferentes. Las personas con el grupo sanguíneo AB poseen ambas enzimas, mientras que aquellos con el grupo sanguíneo O carecen de enzimas capaces de enlazar cualquiera de los azúcares terminales. Las modificaciones ABO de los carbohidratos se encuentran en muchos otros tejidos además de la sangre, y la variación genética en el gen AB es un fuerte predictor de riesgo para el cáncer de páncreas, la enfermedad cardiaca y la infección viral, pero la función bioquímica de los antígenos de los grupos sanguíneos ABO permanece en el misterio.

### REPASO

1. ¿Qué es un oligosacárido? ¿Cómo están ligados a las proteínas de membrana? ¿Cómo están relacionados con los grupos sanguíneos humanos?

## 4.4 Proteínas de membrana

En dependencia del tipo de célula y el organelo particular dentro de esa célula, una membrana puede contener cientos de proteínas diferentes. Cada proteína de membrana tiene una orientación definida relativa al citoplasma, de modo que las propiedades de una superficie de membrana son muy diferentes a las de la otra superficie (como en la figura 4-4*a*). Esta asimetría se conoce como "lateralidad" de la membrana. En la membrana plasmática, por ejemplo, aquellas partes de las proteínas de membrana que interactúan con otras células o con sustancias extracelulares están expuestas al espacio extracelular, mientras que aquellas partes de proteínas de membrana que interactúan con las moléculas citoplasmáticas están expuestas al citosol. Las proteínas de membrana pueden agruparse en tres clases diferentes que se distinguen por la intimidad de su relación con la bicapa lipídica (véase **FIGURA 4-13**). Estas son:

1. **Proteínas integrales** (consúltese figura 4-13*a*) que penetran en la bicapa lipídica. Las proteínas integrales son **proteínas**

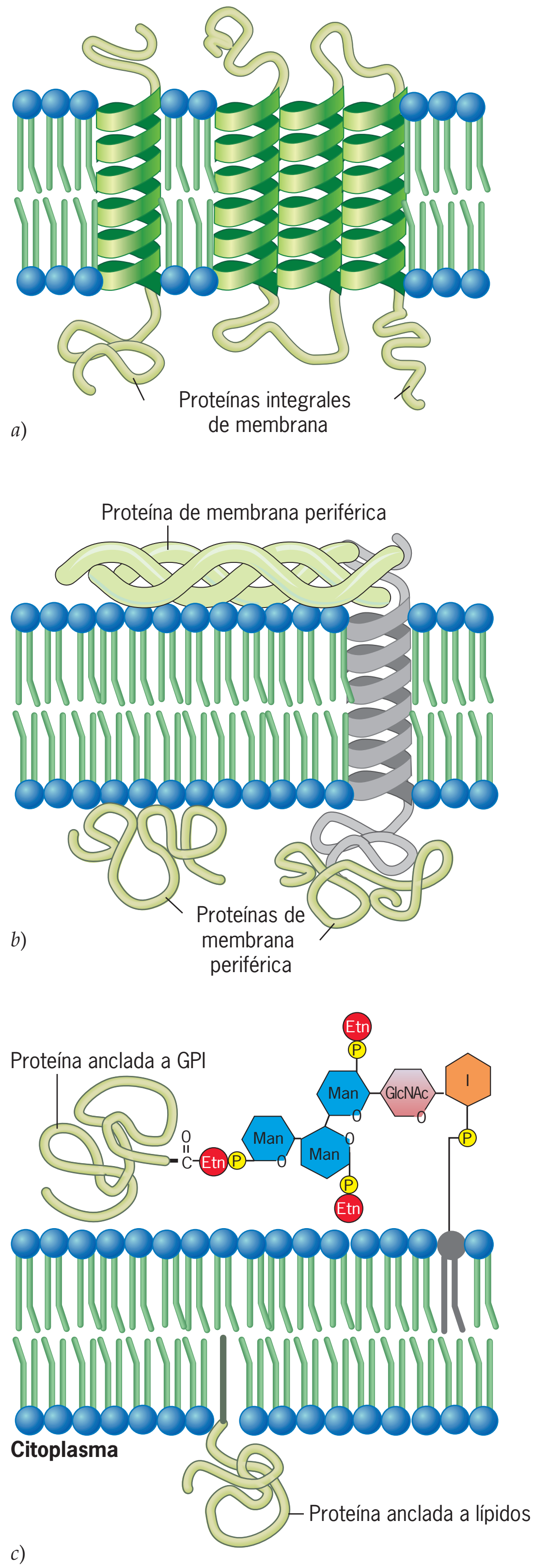



**FIGURA 4-13 Tres clases de proteína de membrana.** *a*) Las proteínas integrales por lo general contienen una o más hélices transmembrana (véase figura 5-4 para una excepción). *b*) Las proteínas periféricas están unidas en forma no covalente a los grupos cabeza polar de la bicapa lipídica y/o a una proteína integral de membrana. c) Las proteínas ancladas a lípidos se unen en forma covalente a un grupo de lípidos que residen dentro de la membrana. El lípido puede ser fosfatidilinositol, un ácido graso, o un grupo prenilo (un hidrocarburo de cadena larga construido a partir de unidades isoprenoides de cinco carbonos). I: inositol; GlcNAc: *N*-acetilglucosamina; Man: manosa; Etn: etanolamina; GPI; glicosilfosfatidilinositol.

**transmembrana**; es decir, traspasan totalmente la bicapa lipídica, y por ello tienen dominios que sobresalen de los lados extracelular y citoplásmico de la membrana. Algunas proteínas integrales tienen un solo segmento abarcador de membrana, mientras que otras son multiabarcadoras. Los estudios de secuenciación del genoma sugieren que las proteínas integrales constituyen 25-30% de todas las proteínas codificadas, y alrededor de 60% de todos los objetivos farmacológicos actuales.

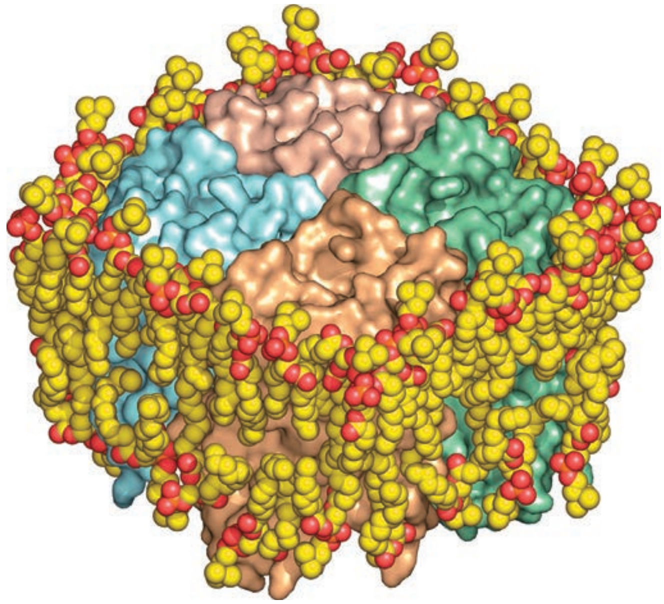
2. **Proteínas periféricas** (véase figura 4-13*b*) que se localizan completamente fuera de la bicapa lipídica, ya sea en el lado citoplásmico o extracelular, aunque asociadas con la superficie de la membrana por enlaces no covalentes.
3. **Proteínas ancladas a lípidos** (véase figura 4-13*c*) que se localizan fuera de la bicapa lipídica, ya sea en la superficie extracelular o citoplásmica, pero unidas en forma covalente a una molécula de lípido que se encuentra dentro de la bicapa.

## Proteínas integrales de membrana

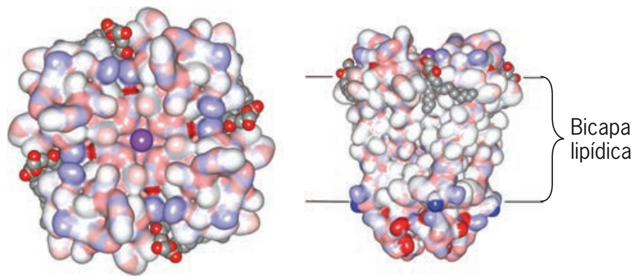
La mayoría de las proteínas integrales de membrana funcionan en las siguientes capacidades: como receptoras que unen sustancias específicas en la superficie de la membrana, como canales o transportadores involucrados en el movimiento de iones y solutos a través de la membrana, o como agentes que transfieren electrones durante los procesos de fotosíntesis y respiración. Al igual que los fosfolípidos de la bicapa, las proteínas integrales de membrana también son anfipáticas, y tienen porciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Como se analiza a continuación, aquellas porciones de una proteína de membrana integral que residen dentro de la bicapa lipídica —los dominios transmembrana— tienden a tener un carácter hidrofóbico. Los residuos de aminoácidos en los dominios transmembrana forman interacciones de Van der Waals con las cadenas de acilo graso de la bicapa, que sella la proteína en la "pared" lipídica de la membrana. Como resultado, la barrera de permeabilidad de la membrana se conserva, la proteína se ancla dentro de la bicapa y se pone en contacto directo con las moléculas de lípidos circundantes (consúltese **FIGURA 4-14*a***). Según el consenso actual, la mayoría de las moléculas de lípidos que entran en contacto con un dominio transmembrana, como las que se muestran en la figura 4-14*a*), son simplemente espectadores pasivos y se intercambian rápidamente con otras moléculas de lípidos en la bicapa. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que ciertos sitios en la superficie de muchas proteínas de membrana sí forman importantes interacciones funcionales con moléculas específicas de lípidos. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 14-4*b*), donde se observa que las moléculas lipídicas aniónicas se unen en la grieta en las interfaces entre las subunidades de un canal $K^+$ KcsA tetramérico. El canal normalmente no se abre en una bicapa que carezca de estas moléculas lipídicas específicas.

Aquellas porciones de una proteína de membrana integral que se proyectan hacia el citoplasma, o hacia el espacio extracelular, tienden a ser más parecidas a las proteínas globulares discutidas en la sección 2.10. Estos dominios no incrustados tienden a tener superficies hidrofílicas que interactúan con sustancias solubles en agua en el borde de la membrana (sustratos de bajo peso molecular, hormonas y otras proteínas). En algunas proteínas de membrana, los dominios transmembrana están esencialmente desprovistos de moléculas de agua, mientras que otros permiten que el disolvente acuoso penetre profundamente en las regiones de la proteína incrustada en la membrana. Varias grandes familias de proteínas de membrana contienen un canal interior que proporciona un conducto acuoso a través de la bicapa lipídica. Los revestimientos de estos canales suelen contener residuos hidrofílicos clave en lugares estratégicos. Como se discutirá más adelante, las proteínas integrales no necesitan ser estructuras fijas, sino que se pueden mover lateralmente dentro de la membrana.

El concepto de que las proteínas penetran a través de las membranas, en lugar de simplemente permanecer fuera de la bicapa, se derivó principalmente de los resultados de una técnica llamada **replicación fractura por congelación** (véase sección 18.5). En este procedimiento el tejido se congela y luego se golpea con una cuchilla, lo que fractura el bloque en dos partes. Cuando esto ocurre, el plano de fractura a menudo toma un camino entre las dos capas de la bicapa lipídica (consúltese **FIGURA 4-15*a***). Una vez que las membranas se dividen de esta manera, se depositan metales en las superficies expuestas para formar una *réplica* sombreada que se ve en el microscopio electrónico (véase figura 18-20). Como se muestra en la figura 4-15*b*), la réplica se asemeja a una carretera sembrada de guijarros, denominados *partículas asociadas a la membrana*. Como el plano de fractura pasa por el centro de la bicapa, la mayoría de estas partículas corresponden a proteínas integrales de la membrana, que se extienden al menos has-



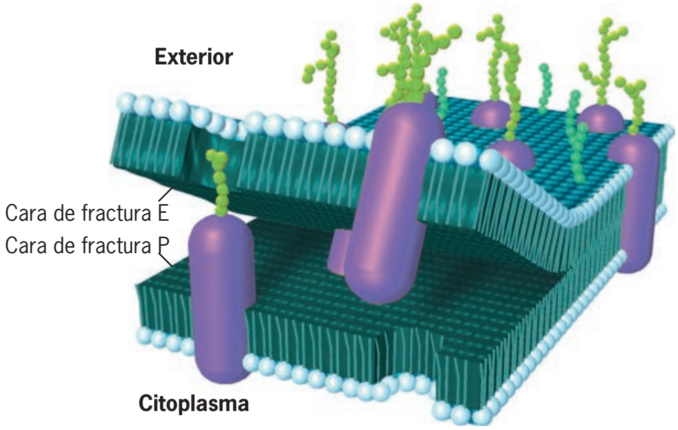
*a*)



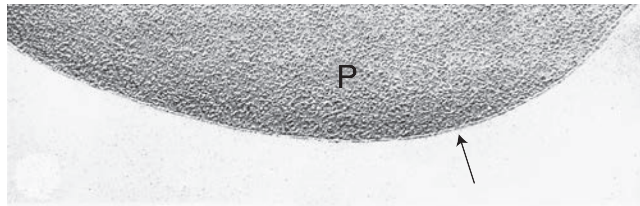

*b*)

**FIGURA 4-14 Interacciones entre proteínas y lípidos de membrana.** *a*) La acuaporina es una proteína de membrana que contiene cuatro subunidades (coloreadas de forma diferente en la ilustración), y cada subunidad contiene un canal acuoso. El análisis de la estructura de la proteína reveló la presencia de una capa circundante de moléculas lipídicas unidas. En este caso esas moléculas de lípidos probablemente no desempeñan un papel en la función de la acuaporina, porque la proteína conserva su función como un canal de agua en bicapas que contienen lípidos no nativos. *b*) Dos vistas de otra proteína de membrana tetramérica, en este caso el canal $K^+$ bacteriano, KcsA. Las moléculas de fosfatidilglicerol aniónico (rojo/gris) se ven en cada hendidura entre las subunidades, y se cree que son necesarias para la función del canal normal. Se ve un ion $K^+$ (esfera púrpura) en tránsito a través del poro.

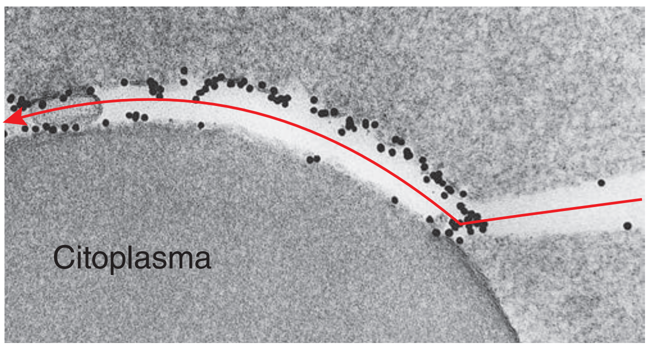
FUENTE: *a*) De Carola Hunte y Sebastian Richers, *Curr Opin Struct Biol* 18:407, © 2008, con permiso de Elsevier Science; *b*) De Anthony G. Lee, *Trends Biochem Sci* 36:497, © 2011, con permiso de Elsevier Science.




a)




b) 0.2 μm




c) 0.3 μm

**FIGURA 4-15 Fractura por congelación: una técnica para investigar la estructura de la membrana celular.** *a*) Cuando un bloque de tejido congelado se golpea con una cuchilla, un plano de fractura atraviesa el tejido, a menudo siguiendo un camino que lo lleva por el centro de la bicapa lipídica. El plano de fractura rodea las proteínas en lugar de romperlas por la mitad, que se segregan junto a una de las dos mitades de la bicapa. Las caras expuestas dentro del centro de la bicapa se pueden cubrir con un depósito de metal para formar una réplica metálica. Estas caras expuestas se conocen como E, o cara ectoplásmica, y P, o cara protoplásmica. *b*) Réplica de un eritrocito humano fracturado por congelación. La cara de fractura P se ve cubierta con partículas de aproximadamente 8 nm de diámetro. Una pequeña cresta (flecha) marca la unión de la cara de la partícula con el hielo circundante. *c*) Esta micrografía muestra la superficie de un eritrocito que se congeló y luego se fracturó, pero en lugar de preparar una réplica la célula se descongeló, se fijó, y se marcó con un marcador para los grupos de carbohidratos que se proyectan desde la superficie externa de la proteína incrustada glicoforina (véase figura 4-18). Las secciones delgadas de la célula fracturada y etiquetada revelan que las moléculas de glicoforina (partículas negras) se han segregado con preferencia en la mitad externa de la membrana. La línea roja muestra la ruta del plano de fractura.

FUENTE: *b*) De Thomas W. Tillack y Vincent T. Marchesi. *J Cell Biol* 1970;45:649, reproducida con permiso de The Rockefeller University Press; *c*) De Pedro Pinto Da Silva y Maria R. Torrisi. *J Cell Biol* 1982;93:467, reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

ta la mitad del núcleo lipídico. Cuando el plano de fractura alcanza una partícula dada, gira alrededor de ella en lugar de partirla a la mitad. En consecuencia, cada proteína (partícula) se separa con la mitad de la membrana plasmática (obsérvese figura 4-15*c*), deja un orificio correspondiente en la otra mitad (véase figura 7-27c). Uno de los grandes valores de la técnica de fractura por congelación es que permite una investigación de la microheterogeneidad de la membrana. Las diferencias localizadas en las partes de la membrana se destacan en estas réplicas y se pueden identificar (como se ilustra en la réplica de una unión gap que se muestra en la figura 7-30d). Los análisis bioquímicos, en cambio, promedian esas diferencias.

## Proteínas periféricas de membrana

Las proteínas periféricas están asociadas a la membrana por enlaces electrostáticos débiles (consúltese figura 4-13b). Por lo general, las proteínas periféricas se pueden solubilizar mediante extracción con soluciones salinas de alta concentración, que debilitan los enlaces electrostáticos que asocian las proteínas periféricas a la membrana. En realidad, la distinción entre proteínas integrales y periféricas es borrosa, porque muchas proteínas integrales de membrana contienen varios polipéptidos; algunos penetran en la bicapa lipídica y otros permanecen en la periferia.

Las proteínas periféricas mejor estudiadas se encuentran en la superficie interna (citosólica) de la membrana plasmática, donde forman una red fibrilar que actúa como un "esqueleto" de membrana (véase figura 4-32d). Estas proteínas proporcionan soporte mecánico para la membrana, y funcionan como un ancla para proteínas integrales de membrana. Otras proteínas periféricas en la superficie interna de la membrana plasmática funcionan como enzimas, como capas especializadas (véase figura 8-24), o como factores que transmiten señales transmembrana (véase figura 15-19). Es típico que las proteínas periféricas tengan una relación dinámica con la membrana, sean reclutadas por la membrana o liberadas de esta, en dependencia de las condiciones prevalecientes.

## Proteínas de membrana ancladas a lípidos

Se pueden distinguir varios tipos de proteínas de membrana ancladas a lípidos. Numerosas proteínas presentes en la cara externa de la membrana plasmática están unidas a la membrana por un oligosacárido pequeño y complejo, unido a una molécula de fosfatidilinositol que está incrustada en la capa externa de la bicapa lipídica (consúltese figura 4-13*c*). Las proteínas de membrana periférica que contienen este tipo de enlace de glucosilfosfatidilinositol GPI se llaman **proteínas ancladas a GPI**. Fueron descubiertas cuando se demostró que ciertas proteínas de membrana podían ser liberadas por una fosfolipasa, que reconocía con especificidad y segmentaba fosfolípidos que contenían inositol. La proteína priónica celular normal $PrP^C$ (página 63) es una molécula unida a GPI, al igual que varios receptores, enzimas y proteínas de adhesión celular. Un tipo raro de anemia, la hemoglobinuria paroxística nocturna, es el resultado de una deficiencia en la síntesis de GPI que hace que los glóbulos rojos sean susceptibles a la lisis.

Otro grupo de proteínas presentes en el lado *citoplasmático* de la membrana plasmática está anclado a la membrana por una o más cadenas largas de hidrocarburo, incrustadas en la capa interna de la bicapa lipídica [consúltese figura 4-13*c*) y leyenda que lo acompaña]. Al menos dos proteínas asociadas de esta manera con la membrana plasmática (Src y Ras) han sido implicadas en la transformación de una célula normal a un estado maligno.

**REPASO**

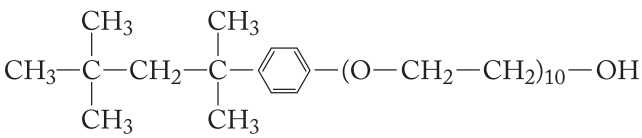
1. ¿Qué significa la afirmación de que las proteínas de una membrana se distribuyen asimétricamente? ¿Esto también es cierto para los carbohidratos de membrana?
2. Describa las propiedades de las tres clases de proteínas de membrana (integral, periférica y anclada a lípidos), cómo se diferencian unas de otras, y cómo varían entre ellas.

## 4.5 Estudio de la estructura y propiedades de las proteínas integrales de membrana

Debido a sus dominios hidrofóbicos transmembrana, las proteínas integrales de membrana son difíciles de aislar en forma soluble. La eliminación de estas proteínas de membrana suele requerir el uso de un detergente, como el detergente iónico (cargado) SDS (que desnaturaliza las proteínas), o el detergente no iónico (sin carga) Tritón X-100 (que por lo general no altera la estructura terciaria de la proteína)

$$CH_3—(CH_2)_{11}—OSO_3^-Na^+$$

Sodio dodecilsulfato (SDS)



Tritón X-100

Al igual que los lípidos de membrana, los detergentes son anfipáticos y se componen de un extremo polar y una cadena de hidrocarburo no polar (véase figura 2-20). Debido a su estructura, los detergentes pueden sustituir a los fosfolípidos en la estabilización de las proteínas integrales, al tiempo que los hacen solubles en solución acuosa (consúltese **FIGURA 4-16**). Una vez que el detergente ha solubilizado las proteínas, se pueden llevar a cabo diversos análisis para determinar la composición de aminoácidos de la proteína, la masa molecular, la secuencia de aminoácidos, y así sucesivamente.

Los investigadores han tenido grandes dificultades para obtener cristales de la mayoría de las proteínas integrales de membrana para su uso en la cristalografía de rayos X. De hecho, menos de 1% de las estructuras de proteínas de alta resolución conocidas representan proteínas integrales de membrana.[2] Además, la mayoría de estas estructuras representan versiones procarióticas de una proteína particular, que a menudo son más pequeñas que sus homólogos eucarióticos y más fáciles de obtener en gran cantidad. Una vez que se determina la estructura de un miembro de una familia de proteínas de membrana, por lo general los investigadores pueden aplicar una estrategia, llamada *modelado de homología*, para aprender sobre la estructura y la actividad de otros miembros de la familia. Por ejemplo, la solución de la estructura del canal bacteriano de $K^+$ KcsA (que se muestra en la figura 4-39) proporcionó una gran cantidad de datos que podrían aplicarse a la estructura y mecanismo de acción de los canales de $K^+$ eucarióticos, mucho más complejos (obsérvese figura 4-42).

En la **FIGURA 4-17*a*)** se muestra una de las primeras proteínas de membrana cuya estructura tridimensional completa se determinó mediante cristalografía de rayos X. Esta proteína, el centro de reacción de fotosíntesis bacteriana, consta de tres subunidades que contienen 11 hélices a través de la membrana. La mayoría de las proteínas de membrana no han sido tan aptas para la cristalización como el centro de reacción de fotosíntesis. Entre los obstáculos, muchas proteínas de membrana 1) están presentes en números bajos por célula, 2) son inestables en las disoluciones que contienen el detergente necesario para su extracción, 3) son

[2] Muchas proteínas integrales de membrana tienen una porción sustancial presente en el citoplasma o el espacio extracelular. En muchos casos esta porción soluble se ha escindido de su dominio transmembrana, ha cristalizado y se ha determinado su estructura terciaria. Si bien este enfoque proporciona datos valiosos sobre la proteína, no proporciona información sobre la orientación de la proteína dentro de la membrana.

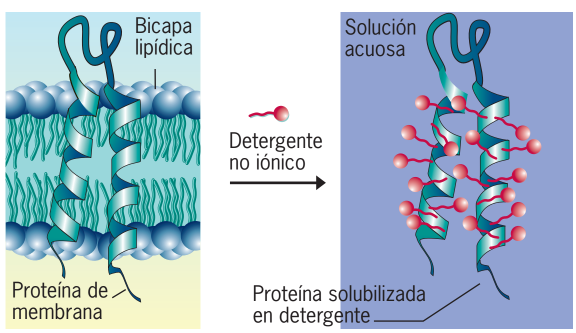
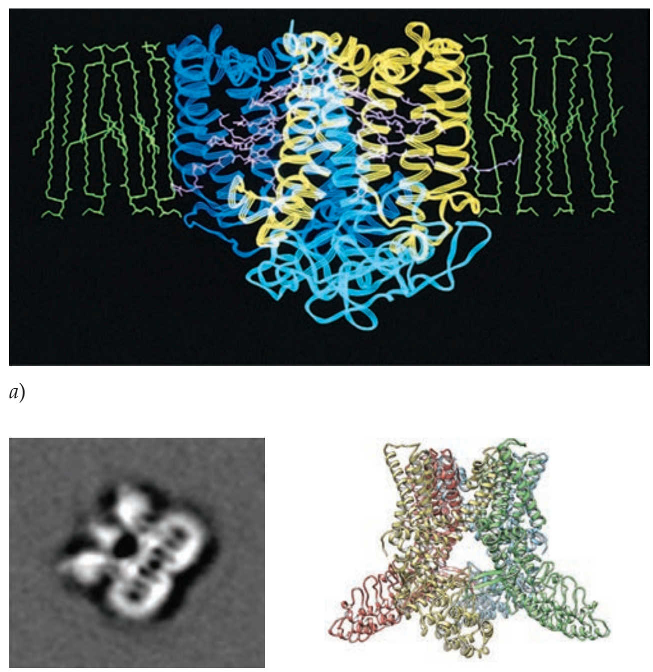



**FIGURA 4-16 Solubilización de proteínas de membrana con detergentes.** Los extremos no polares de las moléculas de detergente se asocian con los residuos no polares de la proteína, que previamente habían estado en contacto con las cadenas de acilo graso de la bicapa lipídica. Por el contrario, los extremos polares de las moléculas de detergente interactúan con las moléculas de agua circundantes, lo que mantiene la proteína en solución. Como se muestra aquí, los detergentes no iónicos solubilizan las proteínas de membrana sin alterar su estructura.



*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 4-17 Estructura de proteínas incrustadas.** *a*) Estructura terciaria del centro de reacción de fotosíntesis de una bacteria, determinada por cristalografía de rayos X. La proteína contiene tres polipéptidos diferentes que se extienden por la membrana, mostrados en amarillo, azul claro y azul oscuro. La naturaleza helicoidal de cada uno de los segmentos transmembrana es evidente. *b*) Imágenes de microscopia electrónica de alta resolución del canal de iones TRPV, reconstruidas promediando muchas micrografías electrónicas individuales de proteínas congeladas en hielo a bajas temperaturas (microscopia crioelectrónica). *c*) Estructura del canal TRPV determinado por microscopia electrónica.

FUENTE: *a*) De G Feher, JP Allen, MY Okamura, DC Rees. *Ature* 339:113, © 1989; reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd; *b*, *c*) De Maofu Liao *et al*. *Nature* 2013;504:107.

propensas a la agregación y 4) están muy modificadas por glucosilación y no se pueden expresar como proteínas recombinantes en otros tipos de células. Algunas de las dificultades técnicas en la preparación de cristales de proteínas de membrana se han superado con nuevas metodologías y laboriosos esfuerzos. Por ejemplo, en un estudio los investigadores lograron obtener cristales de alta calidad de un transportador bacteriano después de probar y refinar más de 95 000 condiciones diferentes de cristalización. En algunos casos se encuentra que las versiones mutantes de una proteína de membrana son más adecuadas para formar las matrices ordenadas de moléculas que forman una red cristalina. En muchos otros casos la cristalización se ha logrado uniendo en forma covalente la proteína de membrana a otras moléculas, a menudo pequeñas proteínas solubles. Recientes avances en la tecnología de microscopia electrónica han permitido determinar la estructura de la proteína de la membrana a alta resolución, al generar imágenes de grandes cantidades de proteínas idénticas a temperaturas muy bajas —para reducir el ruido de las imágenes— y luego promediar sus imágenes (véase figura 4-17*b*). Debido a que la microscopia se realiza a temperaturas muy bajas, se le conoce como microscopia citoelectrónica (*consúltese el video experimental tutorial para este capítulo:* **“Cómo resolver estructuras proteicas usando crio-EM”**). Mediante este enfoque ahora es posible ver cadenas laterales de aminoácidos individuales, y reconstruir completamente una estructura molecular a partir de la información de la microscopia electrónica (obsérvese figura 4-17*c*).

A pesar del creciente éxito en la cristalización de proteínas y de los rápidos avances en microscopia crioelectrónica, los investigadores todavía dependen en gran medida de los enfoques indirectos para determinar la organización tridimensional de la mayoría de las proteínas de membrana. Examinaremos algunos de estos enfoques en los siguientes párrafos.

## Identificación de dominios transmembrana

Se puede aprender mucho sobre la estructura de una proteína de membrana, y su orientación dentro de la bicapa lipídica, a partir de un análisis basado en computadoras (computacional) de su secuencia de aminoácidos, que se deduce fácilmente a partir de la secuencia de nucleótidos de un gen aislado. La primera pregunta que uno se podría hacer es: ¿Qué segmentos de la cadena polipeptídica están realmente incrustados en la bicapa lipídica? Esos segmentos de proteína incrustados dentro de la membrana, que se describen como los **dominios transmembrana**, tienen una estructura simple; consisten en una cadena de aproximadamente 20 aminoácidos de predominio no polar, que abarcan el núcleo de la bicapa lipídica como una hélice.[3] La estructura química de una única hélice transmembrana se muestra en la **FIGURA 4-18**, que representa la estructura bidimensional de la glicoforina A, la principal proteína integral de la membrana plasmática eritrocítica. De los 20 aminoácidos que componen la única hélice α de un monómero de glicoforina (aminoácidos 73 a 92 de la figura 4-18), todos menos tres tienen cadenas laterales hidrofóbicas (o un átomo de H en el caso de los residuos de glicina). Las excepciones son serina y treonina, que son residuos polares no cargados (véase figura 2-26). La **FIGURA 4-19*a*)** muestra una porción de una hélice transmembrana con un residuo de treonina, no diferente al de la glicoforina A. El grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo puede formar un enlace de hidrógeno con uno de los átomos de oxígeno de la estructura peptídica. Los residuos completamente cargados también pueden aparecer en las hélices transmembrana, pero tienden a estar cerca de uno de los extremos de la hélice, y se deben acomodar en formas que les permitan encajar en su entorno hidrofóbico. Esto se ilustra en las hélices transmembrana modelo que se muestran en las figuras 4-19*b*) y *c*). Cada una de las hélices en estas figuras contiene un par de residuos cargados, cuyas cadenas laterales son capaces de alcanzar e interactuar con las regiones polares más internas de la membrana, incluso si se requiere distorsionar la hélice para hacerlo. La figura 4-19*d*) muestra dos residuos de tirosina con sus cadenas laterales aromáticas hidrofóbicas; cada anillo aromático está orientado en paralelo a las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa con la que se ha integrado.

[3] Se observó en la página 54 que la hélice α es una conformación favorecida, porque permite que se forme un número máximo de enlaces de hidrógeno entre los átomos de la cadena principal del polipéptido, y se crea así una configuración altamente estable (baja energía). Esto es particularmente importante para un polipéptido que abarca la membrana, rodeado por cadenas de acilo graso, y que por tanto no puede formar enlaces de hidrógeno con un disolvente acuoso. Las hélices transmembrana tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, porque este es el tramo mínimo de polipéptido capaz de atravesar el núcleo de hidrocarburo de una bicapa lipídica de 30 Å de ancho. Se ha encontrado que algunas proteínas integrales de membrana contienen bucles o hélices que penetran la bicapa, pero no la abarcan. Un ejemplo es la hélice P en la figura 4-39.

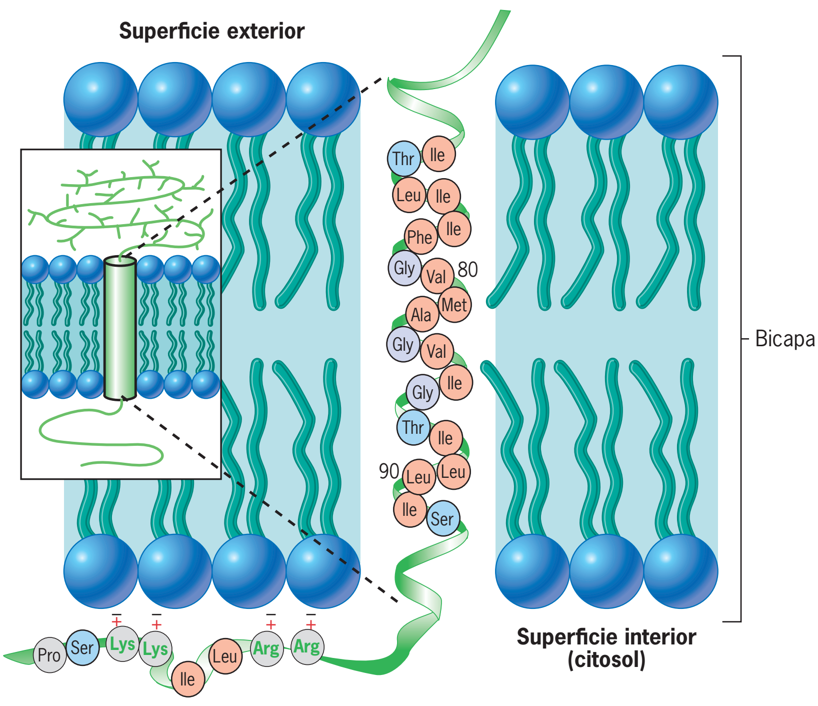
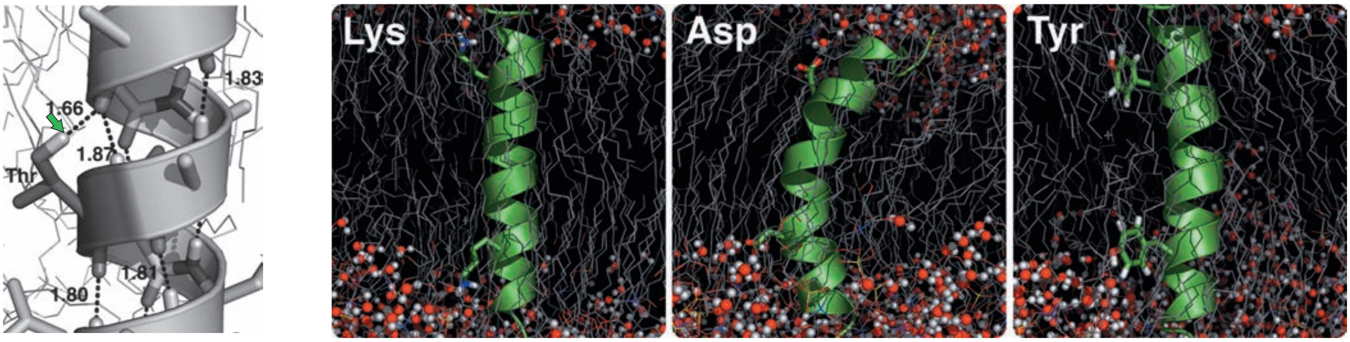



**FIGURA 4-18 La glicoforina A, una proteína integral con un único dominio transmembrana.** La única hélice α que pasa a través de la membrana consiste de manera predominante en residuos hidrofóbicos (círculos de color marrón). Los cuatro residuos de aminoácidos cargados positivamente del dominio citoplasmático de la proteína de membrana forman enlaces iónicos con grupos cabeza de lípidos cargados negativamente. Los carbohidratos están unidos a varios residuos de aminoácidos en la superficie externa de la proteína (mostrado en el recuadro). Todos menos uno de los 16 oligosacáridos son pequeñas cadenas con enlaces O (la excepción es un oligosacárido mayor unido al residuo de asparagina en la posición 26). Las moléculas de glicoforina están presentes como homodímeros dentro de la membrana de eritrocitos (véase figura 4-32*d*). Las dos hélices del dímero se cruzan una sobre otra en la región entre los residuos 79 y 83. Esta secuencia Gly-X-X-X-Gly se encuentra por lo común donde las hélices transmembrana se acercan mucho.




*a*) *b*) *c*) *d*)

**FIGURA 4-19 El acomodo de varios residuos de aminoácidos dentro de las hélices transmembrana.** *a*) En esta imagen de una pequeña porción de una hélice transmembrana, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de treonina (flecha) es capaz de formar un enlace de hidrógeno (compartido) con un oxígeno de cadena principal dentro de la bicapa lipídica. Los enlaces de hidrógeno están indicados por las líneas punteadas y sus distancias se muestran en angstroms. *b*) Las cadenas laterales de los dos residuos de lisina de esta hélice transmembrana son largas y flexibles, lo suficiente como para formar enlaces con los grupos cabeza y las moléculas de agua de la cara polar de la bicapa lipídica. *c*) Las cadenas laterales de los dos residuos de ácido aspártico de esta hélice transmembrana también pueden alcanzar la cara polar de la bicapa, pero introducen distorsión en la hélice al hacerlo. *d*) Las cadenas laterales aromáticas de los dos residuos de tirosina de esta hélice transmembrana están orientadas perpendicularmente al eje de la membrana, y paralelas a las cadenas de acilo graso con las que interactúan.

FUENTE: *a-d*) de Anna CV Johansson y Erik Lindahl. *Biophys J* 2006;91:4459-4453, © 2006, con permiso de Elsevier.

Si se conoce la secuencia de aminoácidos de una proteína integral de membrana, usualmente es posible identificar los segmentos transmembrana usando un *gráfico de hidropatía*, donde a cada sitio a lo largo de un polipéptido se le asigna un valor que da una medida de la *hidrofobicidad* del aminoácido en ese sitio, así como en el de sus vecinos. Este enfoque proporciona un "promedio de dirección" de la hidrofobicidad en secciones cortas del polipéptido, y garantiza que uno o unos pocos aminoácidos polares en una secuencia no alteren el perfil de todo el estiramiento. La hidrofobicidad de aminoácidos se puede determinar usando diversos criterios, como su solubilidad en lípidos, o la energía que se requeriría para transferirlos de un medio no polar a un medio acuoso. En la **FIGURA 4-20** se muestra un gráfico hidropático para la glicoforina A. Los segmentos transmembrana por lo general se identifican como un pico irregular que se extiende bien adentro del lado hidrofóbico del espectro. Una predicción confiable, concerniente a la orientación del segmento transmembrana dentro de la bicapa, se puede hacer de manera habitual al examinar los residuos de aminoácidos de los flancos. En la mayoría de los casos, como se ilustra en la glicoforina en la figura 4-18, esas partes del polipéptido en el flanco citoplásmico de un segmento transmembrana tienden a estar más cargadas positivamente que aquellas en el flanco extracelular.

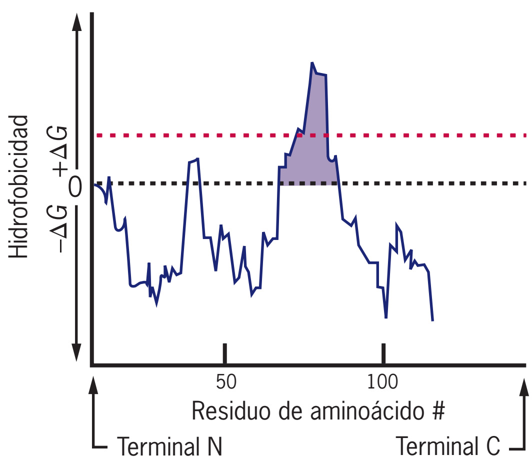



**FIGURA 4-20 Gráfico de hidropatía para la glicoforina A, una proteína simple que se extiende a lo largo de la membrana.** La hidrofobicidad se mide por la energía libre requerida para transferir cada segmento del polipéptido desde un disolvente no polar a un medio acuoso. Los valores por encima de la línea 0 requieren energía (+ΔG), lo que indica cadenas laterales de predominio no polar. Los picos que se proyectan por encima de la línea roja indican tramos continuos de aminoácidos en su mayoría no polares, y se interpretan como dominios transmembrana.

No todas las proteínas integrales de membrana contienen hélices α transmembrana. Varias proteínas de membrana contienen un canal relativamente grande colocado dentro de un círculo de cadenas β que se extienden por la membrana organizadas en un barril, como se ilustra en la figura 5-4. Hasta la fecha, los canales acuosos construidos de barriles β solo se han encontrado en las membranas externas de bacterias, mitocondrias y cloroplastos.

## Enfoques experimentales para identificar cambios de conformación dentro de una proteína integral de membrana

Supongamos que se ha aislado un gen para una proteína de membrana integral, y basándose en su secuencia de nucleótidos se ha determinado que contiene 12 aparentes hélices α que se extiende a lo largo de la membrana. Es posible que se desee saber qué sitios dentro de estos dominios transmembrana son accesibles para el ambiente acuoso, y cómo esto cambia a medida que la proteína cumple su función. Este tipo de información es de particular importancia cuando se trabaja con un canal de membrana, o un transportador que funciona en el movimiento de sustancias hidrófilas a través de la membrana. Aunque estas determinaciones son difíciles de realizar sin modelos estructurales detallados, se puede obtener una visión considerable mediante la mutagénesis dirigida al sitio, es decir, al introducir cambios específicos en el gen que codifica la proteína (consúltese sección 18.25). En la **FIGURA 4-21** se muestra un experimento de este tipo realizado con lactosa permeasa, una proteína transportadora de azúcar en las membranas celulares bacterianas. En este experimento los investigadores prepararon diferentes versiones de la permeasa en las que casi todos los aminoácidos individuales de la proteína fueron reemplazados, uno a la vez, por un residuo de cisteína. Después cada proteína de membrana mutada se incubó con un reactivo soluble en agua (NEM), capaz de añadir un grupo alquilo a la cadena lateral de cisteína, siempre que tenga acceso a esa cadena lateral. Las incubaciones con NEM se llevaron a cabo en dos condiciones diferentes: o bien en presencia del azúcar a transportar, o en su ausencia. La imagen de la figura 4-21*a*) muestra los residuos de la proteína alquilada por NEM *en ausencia del azúcar* (representados como esferas rojas). Se cree que muchos de estos residuos accesibles se alinean en una cavidad hidrofílica, orientada hacia adentro en la permeasa que está abierta al citoplasma. Se presume que los restos de cisteína que no están marcados —más notorio en las hélices

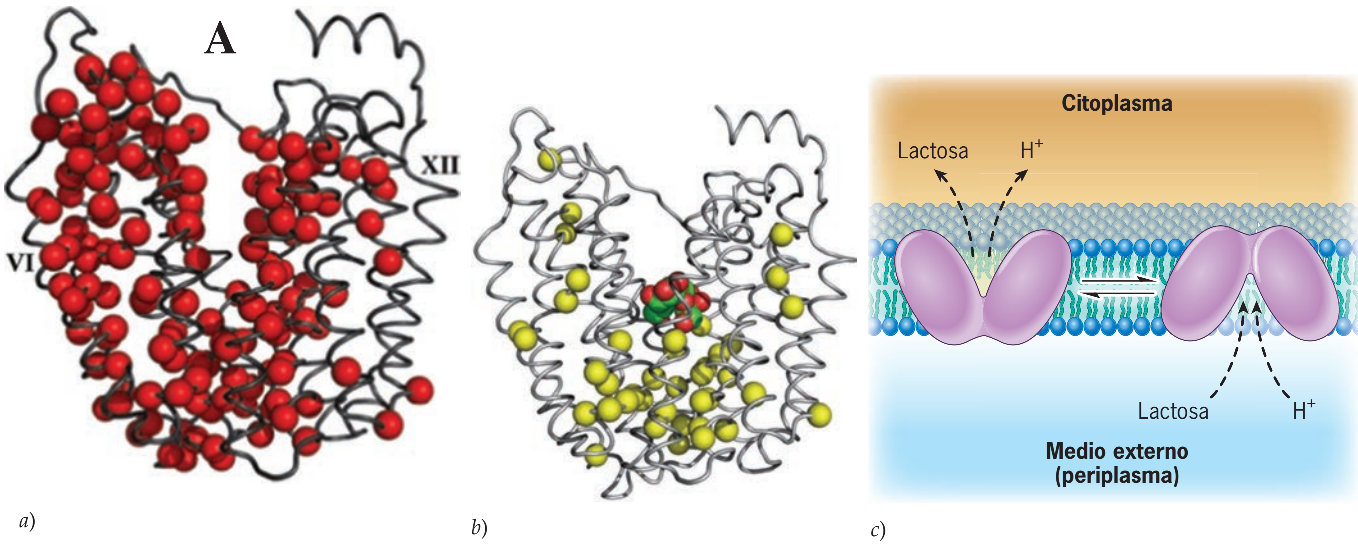



**FIGURA 4-21 Un experimento que emplea mutagénesis dirigida al sitio para aprender sobre los cambios dinámicos en la conformación de una proteína de membrana a medida que lleva a cabo su actividad.** La estrategia práctica del experimento y sus resultados se discuten en el texto. La superficie citoplásmica de la proteína (lactosa permeasa) está en la parte superior. *a*) Las esferas rojas indican los residuos de la proteína de membrana que reaccionó con el agente alquilante NEM en ausencia de un azúcar para ser transportado. *b*) Las esferas doradas denotan los residuos que son mucho más accesibles para el agente alquilante cuando la proteína se incuba con el azúcar. Las esferas doradas en *b*) se agrupan en una porción de la proteína cerca del medio externo (el periplasma en las bacterias). Los autores concluyeron que las esferas doradas corresponden a residuos que recubren una cavidad orientada hacia afuera, es decir, una que está abierta al medio externo. Los resultados apoyan un modelo de acceso alterno al medio como se muestra en la parte *c*). (Nótese que la estructura que se representa en las partes *a-b*) es de la conformación dirigida hacia adentro, según lo determinado por la cristalografía de rayos X).

FUENTE: *a*, *b*) de H. Ronald Kaback, *et al*. *PNAS* 2007;104:492, © 2007 National Academy of Sciences, Estados Unidos; *c*) Reimpreso de *Current Opinion in Structural Biology* 2004;14:414, fig. 1 por HR Kaback, con permiso de Elsevier.

VI y XII— se enfrentan a las cadenas de acilo graso de los fosfolípidos, o se localizan en regiones fuertemente empaquetadas de la molécula, haciéndolos inaccesibles al NEM.

La imagen en la figura 4-21*b*) muestra los residuos (representados como esferas doradas) con un *aumento* significativo de la reactividad al NEM cuando la permeasa se incuba con el azúcar que se va a transportar. La diferencia en la reactividad NEM de los residuos entre las proteínas en ausencia del azúcar *a*) y la presencia del azúcar *b*) indica que las diferentes partes de la proteína son accesibles al medio acuoso en estas dos condiciones. En otras palabras, los resultados sugieren que la adición del azúcar induce un cambio conformacional en la permeasa. El análisis cuidadoso de las posiciones de los residuos que se etiquetan en estas dos conformaciones respalda el modelo que se muestra en la figura 4-21*c*). De acuerdo con este modelo de acceso alterno, el sitio de unión al azúcar está abierto al citoplasma de la célula bacteriana en una conformación, y al espacio extracelular en la otra. La alternancia entre las dos conformaciones provoca el transporte de azúcar a través de la membrana. Este tipo de sistema de transporte impulsado por iones se trata más adelante en la página 155.

La determinación de las relaciones espaciales entre aminoácidos específicos en una proteína de membrana es otro enfoque para aprender sobre los eventos dinámicos que ocurren cuando una proteína lleva a cabo su función. Una forma de aprender sobre la distancia entre los residuos seleccionados en una proteína es introducir grupos químicos cuyas propiedades sean sensibles a la distancia que los separa. Los *nitróxidos* son grupos químicos que contienen un electrón no pareado, que produce un espectro característico cuando se analiza mediante una técnica llamada *espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica* (EPR, *electron paramagnetic resonance*). Se puede introducir un grupo nitróxido en cualquier sitio en una proteína al mutar primero ese sitio a una cisteína y unir luego el nitróxido al grupo —SH del residuo de cisteína. La figura 4-22 muestra cómo se utilizó esta técnica para descubrir los cambios conformacionales que ocurren en una proteína de membrana, a medida que su canal se abre en respuesta a los cambios en el pH del medio. La proteína en cuestión, un canal bacteriano de $K^+$, es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades idénticas. La apertura citoplásmica al canal está limitada por cuatro hélices transmembrana, una de cada subunidad de la proteína. La figura 4-22*a*) muestra los espectros de EPR obtenidos cuando se introdujo un nitróxido cerca del extremo citoplásmico de cada hélice transmembrana. La línea roja muestra el espectro obtenido a pH 6.5 cuando el canal está en el estado cerrado, y la línea azul muestra el espectro a pH 3.5 cuando el canal está abierto. La forma de cada línea depende de la proximidad de los nitróxidos entre sí. El espectro es más amplio a pH 6.5 porque los grupos nitróxido en las cuatro subunidades están más juntos para este pH, lo que disminuye la intensidad de sus señales EPR. Estos resultados indican que la activación del canal se acompaña de una mayor separación entre los residuos marcados de las cuatro subunidades (obsérvese figura 4-22*b*). Un aumento en el diámetro de la apertura del canal permite que los iones en el citoplasma lleguen a la vía de permeación real dentro del canal (que se muestra en rojo), lo que permite solo el paso de iones $K^+$ (explicado en la página 144). En la figura 18-8 se ilustra una técnica alternativa llamada FRET, que también se puede usar para medir los cambios en la distancia entre los grupos etiquetados dentro de una proteína. Como se discutió en el capítulo 2, la espectroscopia de MNR es otra técnica que proporciona información sobre distancias entre átomos en una estructura proteica, y recientemente la MNR se ha convertido cada vez más en el método de elección para estudiar la dinámica de las proteínas de membrana.

## REPASO

1. ¿Por qué son necesarios los detergentes para solubilizar las proteínas de membrana? ¿Cómo se puede determinar la diversidad de las proteínas integrales que residen en una fracción de membrana purificada?
2. ¿Cómo se puede determinar: 1) la ubicación de los segmentos transmembrana en la secuencia de aminoácidos o 2) las ubicaciones relativas de las hélices transmembrana con acceso al medio externo?

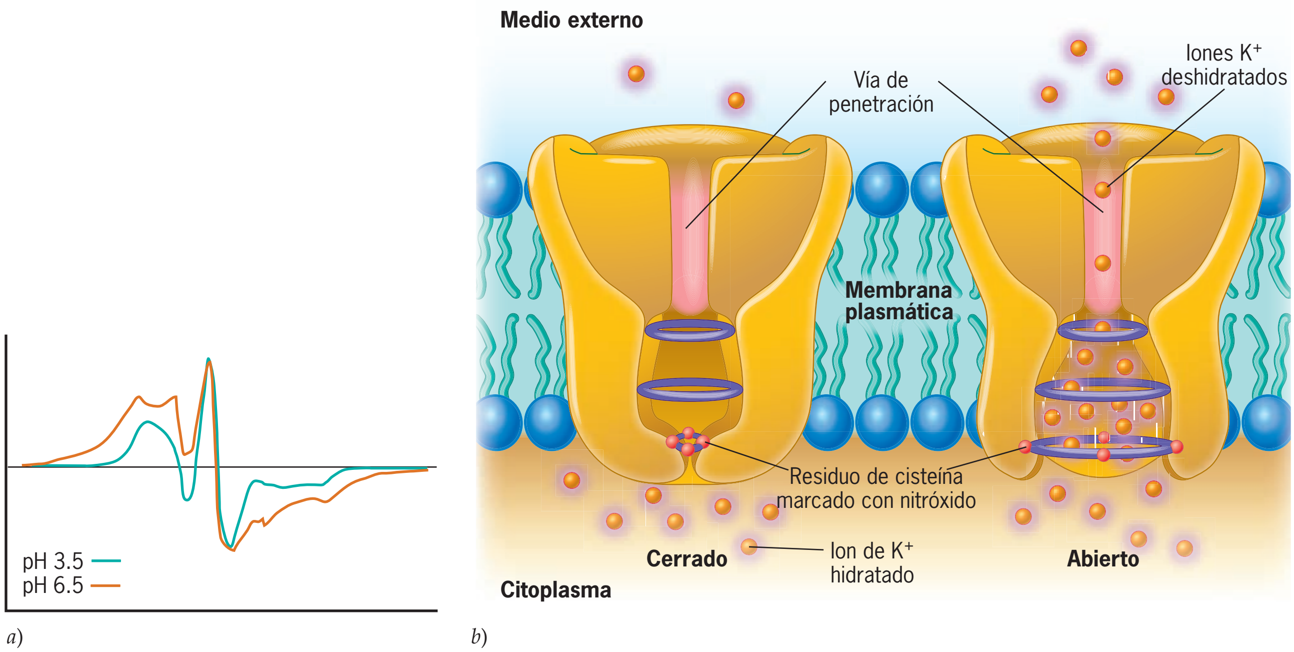



**FIGURA 4-22 Uso de la espectroscopia EPR para registrar los cambios en la conformación de un canal de iones $K^+$ bacteriano a medida que se abre y se cierra.** *a*) Espectros EPR de nitróxidos que se han unido a residuos de cisteína cerca del extremo citoplásmico de las cuatro hélices transmembrana que recubren el canal. El residuo de cisteína en cada hélice reemplaza un residuo de glicina que normalmente está en esa posición. Las formas de los espectros dependen de las distancias entre electrones no pareados en los nitróxidos en las diferentes subunidades. (Los nitróxidos se describen como "etiquetas de espín", y esta técnica se conoce como etiquetado de espín dirigido al sitio). *b*) Un modelo altamente esquemático del canal de iones en los estados abierto y cerrado con base en los datos de la parte *a*). La apertura del canal va acompañada del movimiento de los cuatro grupos de nitróxido separados uno del otro.

FUENTE: *a*) Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd: de E Perozo, *et al*. *Nature Struct Biol* 1998;5:468.

## 4.6 Lípidos de membrana y fluidez de la membrana

El estado físico del lípido de una membrana se describe por su fluidez (o viscosidad).[4] Considere la posibilidad de una bicapa artificial simple compuesta de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, cuyos ácidos grasos son en gran parte insaturados. Si la temperatura de la bicapa se mantiene relativamente caliente (p. ej., 37 °C), el lípido existe en un estado relativamente fluido (véase **FIGURA 4-23*a***).

A esta temperatura la bicapa lipídica se describe mejor como un cristal líquido bidimensional. Como en un cristal, las moléculas aún conservan una orientación específica; en este caso los ejes largos de las moléculas tienden hacia una disposición paralela, aunque los fosfolípidos individuales pueden rotar alrededor de su eje o moverse lateralmente dentro del plano de la bicapa. Si la temperatura baja lentamente se llega a un punto en el que la bicapa cambia bruscamente (véase figura 4-23*b*). El lípido se convierte de una fase cristalina líquida en un gel cristalino congela-

[4] La fluidez y la viscosidad están inversamente relacionadas; la fluidez es una medida de la facilidad de flujo, y la viscosidad es una medida de la resistencia al flujo.

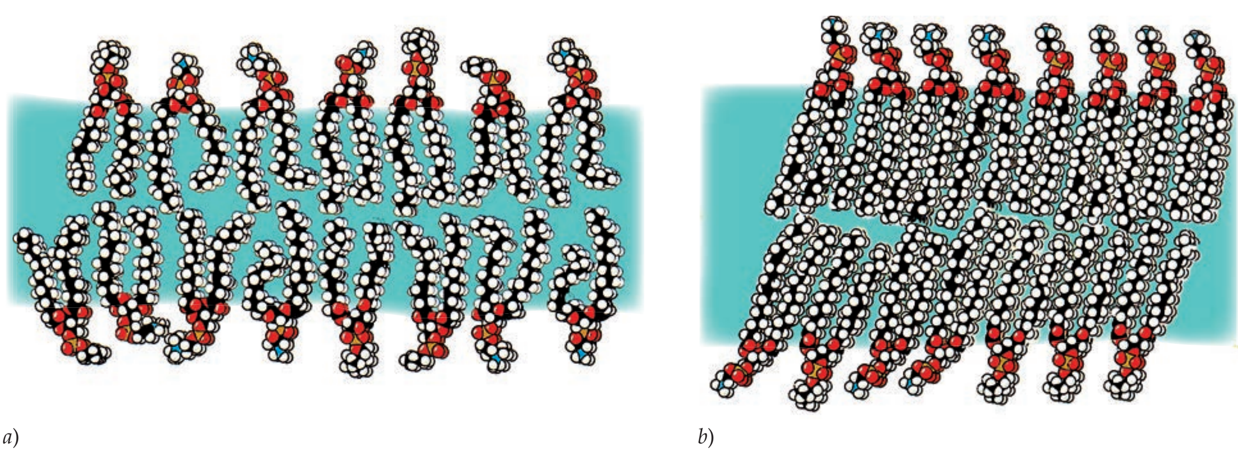



**FIGURA 4-23 La estructura de la bicapa lipídica depende de la temperatura.** La bicapa que se muestra aquí está compuesta de dos fosfolípidos: fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. *a*) Por encima de la temperatura de transición, las moléculas de lípidos y sus colas hidrofóbicas son libres de moverse en ciertas direcciones, a pesar de que conservan un grado considerable de orden. *b*) Por debajo de la temperatura de transición, el movimiento de las moléculas está muy restringido, y toda la bicapa se puede describir como un gel cristalino.

FUENTE: *a*, *b*) RN Robertson. *The Lively Membranes*, Cambridge University Press; 1983, reimpreso con permiso de Cambridge University Press.

do, donde el movimiento de las cadenas de ácidos grasos de fosfolípidos está muy restringido. La temperatura a la que se produce este cambio se denomina **temperatura de transición**.

La temperatura de transición de una bicapa particular depende de la capacidad de las moléculas de lípidos para ser empaquetadas juntas, lo que depende a su vez de los lípidos particulares de los que se construye. Los ácidos grasos saturados tienen la forma de una barra recta y flexible. Los ácidos grasos insaturados *cis*, por otro lado, tienen dobleces en la cadena, en los sitios de un doble enlace (consúltese figuras 2-19 y 4-23). En consecuencia, los fosfolípidos con cadenas saturadas se juntan más apretadamente que aquellos que contienen cadenas insaturadas. Cuanto mayor sea el grado de insaturación de los ácidos grasos de la bicapa, *menor* será la temperatura antes que la bicapa gelifique. La introducción de un doble enlace en una molécula de ácido esteárico reduce la temperatura de fusión a casi 60 °C (véase tabla 4-2).[5] Otro factor que influye en la fluidez de la bicapa es la longitud de la cadena de ácido graso. Cuanto más cortas sean las cadenas de acilo graso de un fosfolípido, menor será su temperatura de fusión. El estado físico de la membrana también se ve afectado por el colesterol. Debido a su orientación dentro de la bicapa (véase figura 4-7), las moléculas de colesterol interrumpen el cierre de las cadenas de acilo graso e interfieren con su movilidad. La presencia de colesterol tiende a abolir las temperaturas precisas de transición y crea una condición de fluidez intermedia. En términos fisiológicos, el colesterol tiende a aumentar la durabilidad al tiempo que disminuye la permeabilidad de la membrana.

## Importancia de la fluidez de la membrana

¿Qué efecto tiene el estado físico de la bicapa lipídica en las propiedades biológicas de la membrana? La fluidez de la membrana proporciona un compromiso perfecto entre una estructura rígida y ordenada en la que la movilidad estaría ausente, y un líquido fluido por completo, no viscoso, en el que los componentes de la membrana no se podrían orientar y la organización estructural y el soporte mecánico serían insuficientes. Además, la fluidez permite que las interacciones tengan lugar dentro de la membrana. Por ejemplo, la fluidez de la membrana hace posible que grupos de proteínas de membrana se ensamblen en sitios particulares dentro de la membrana, y formen estructuras especializadas como uniones intercelulares, complejos de fotosíntesis captadores de luz, y sinapsis. Debido a la fluidez de la membrana las moléculas que interactúan se pueden unir, llevar a cabo la reacción necesaria y separarse.

La fluidez también desempeña un papel clave en el ensamblaje de la membrana, un tema discutido en el capítulo 8. Las membranas solo surgen a partir de membranas preexistentes, y su crecimiento se logra mediante la inserción de lípidos y proteínas en la matriz fluida de la lámina membranosa. Muchos de los procesos celulares más básicos, incluyendo el movimiento celular, crecimiento celular, división celular, formación de uniones intercelulares, secreción y endocitosis, dependen del movimiento de los componentes de la membrana, y probablemente no serían posibles si las membranas fueran estructuras rígidas y no fluidas.

**TABLA 4-2 Puntos de fusión de los ácidos grasos comunes de carbono 18**

| Ácido graso | Doble enlace *cis* | Punto de fusión (°C) |
|---|---|---|
| Ácido esteárico | 0 | 70 |
| Ácido oleico | 1 | 13 |
| Ácido linoleico | 2 | −9 |
| Ácido linolénico | 3 | −17 |
| Ácido eicosapentaenoico (EPA)* | 5 | −54 |

* El EPA tiene 20 carbonos.

[5] El efecto de la saturación de los ácidos grasos sobre la temperatura de fusión se ilustra con productos alimenticios conocidos. Los aceites vegetales permanecen líquidos en el refrigerador, mientras que la margarina es sólida. Los aceites vegetales contienen ácidos grasos poliinsaturados, mientras que los ácidos grasos de la margarina se han saturado mediante un proceso químico que hidrogena los dobles enlaces de los aceites vegetales utilizados como material de partida.

## Mantenimiento de la fluidez de la membrana

La temperatura interna de la mayoría de los organismos (excepto las aves y los mamíferos) fluctúa con la temperatura del ambiente externo. Debido a que es esencial para muchas actividades que las membranas de una célula permanezcan en un estado fluido, las células responden a las condiciones cambiantes al alterar los tipos de fosfolípidos de los que están hechas. El mantenimiento de la fluidez de la membrana es un ejemplo de homeostasis a nivel celular, y se puede demostrar de varias maneras. Por ejemplo, si la temperatura de un cultivo de células se reduce, las células responden metabólicamente. La respuesta inicial de "emergencia" está mediada por enzimas que remodelan las membranas, que hacen que la célula sea más resistente al frío. La remodelación se logra 1) desaturando enlaces simples en cadenas de acilo graso para formar dobles enlaces, y 2) reorganizando las cadenas entre diferentes moléculas de fosfolípidos para producir unos que contienen dos ácidos grasos insaturados, lo que reduce en gran medida la temperatura de fusión de la bicapa. Las enzimas llamadas *desaturasas* catalizan la desaturación de enlaces simples para formar dobles enlaces. Las *fosfolipasas* llevan a cabo la reorganización, al separar el ácido graso de la columna de glicerol; asimismo, las *aciltransferasas*, transfieren ácidos grasos entre los fosfolípidos. Además, la célula cambia los tipos de fosfolípidos que se sintetizan a favor de los que contienen más ácidos grasos insaturados. Como resultado de las actividades de estas diversas enzimas, las propiedades físicas de las membranas celulares se corresponden con las condiciones ambientales predominantes. Se ha demostrado el mantenimiento de las membranas fluidas mediante ajustes en la composición del acilo graso en una variedad de organismos, incluidos los mamíferos hibernantes, los peces que habitan en estanques cuya temperatura corporal cambia marcadamente del día a la noche, las plantas resistentes al frío y las bacterias que viven en aguas termales. Las células procariotas que viven a temperaturas muy altas tienen membranas plasmáticas que contienen lípidos altamente inusuales.

## Balsas lipídicas

De cuando en cuando surge un problema que divide la comunidad de biología celular en creyentes y no creyentes. El problema de las balsas lipídicas cae en esta categoría. Cuando los lípidos de membrana se extraen de las células y se usan para preparar bicapas lipídicas *artificiales*, el colesterol y los esfingolípidos tienden a autoensamblarse en microdominios que están más gelificados y ordenados que las regiones circundantes, y consisten principalmente en fosfoglicéridos. Debido a sus propiedades físicas distintivas, tales microdominios tienden a flotar dentro del entorno más fluido y alterado de la bicapa artificial (consúltese **FIGURA 4-24*a***). Como resultado, estos parches de colesterol y esfingolípidos se conocen como **balsas lipídicas**. Ciertas proteínas tienden a concentrarse en las balsas lipídicas cuando se agregan a las bicapas artificiales, mientras que otras tienden a permanecer fuera de sus límites. Las proteínas ancladas al GPI muestran un particular apego por las regiones ordenadas de la bicapa (véase **FIGURA 4-24*a***).

La controversia surge sobre si existen tipos similares de balsas de lípidos ricas en esfingolípidos y colesterol, como la que se ilustra en la figura 4-24*b*), en existencia dentro de las células vivas. La mayoría de las pruebas a favor de las balsas lipídicas se derivan de estudios que emplean tratamientos no naturales como la extrac-

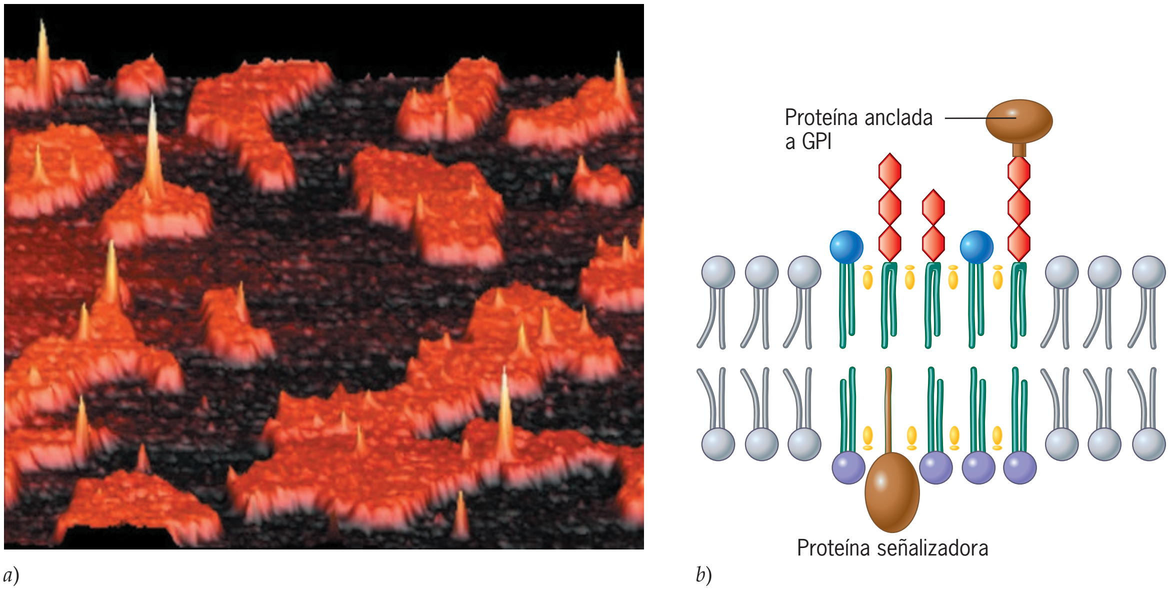



**FIGURA 4-24 Balsas de lípidos**. *a*) Imagen de la superficie superior de una bicapa lipídica artificial que contiene fosfatidilcolina, que aparece como el fondo negro, y moléculas de esfingomielina que se organizan espontáneamente en las balsas de color naranja. Los picos amarillos muestran las posiciones de una proteína anclada al GPI, que está asociada casi exclusivamente a la balsa. Esta imagen es proporcionada por un microscopio de fuerza atómica, que mide la altura de varias partes de la muestra a nivel molecular. *b*) Modelo esquemático de una balsa de lípidos dentro de una célula. La capa exterior de la balsa está compuesta sobre todo por colesterol (amarillo) y esfingolípidos (grupos cabeza rojos). Las moléculas de fosfatidilcolina (grupos cabeza azules), con ácidos grasos saturados largos, también tienden a concentrarse en esta región. Se piensa que las proteínas ancladas al GPI se concentran en las balsas lipídicas. Los lípidos en la capa exterior de la balsa tienen un efecto organizador sobre los lípidos de la capa interna. Como resultado, los lípidos de la capa interna de la balsa consisten principalmente en colesterol y glicerofosfolípidos, con largas colas de acilo graso saturados. La capa interna tiende a concentrar las proteínas ancladas en lípidos —como la Src quinasa— que están implicadas en la señalización celular. (La controversia sobre la existencia de las balsas lipídicas se discute en *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:688, y *Science* 2011;334:1046).

FUENTE: *a*) Tomada de DE Saslowsky, *et al. J. Biol. Chem.* 2002 July 26;277, cover of #30, *b*) Cortesía de J Michael Edwardson © 2002 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

ción de detergente, la reducción del colesterol o la reticulación de proteínas de membrana. La naturaleza artificial de estos tratamientos hace que los resultados sean difíciles de interpretar. Los intentos de demostrar la presencia de balsas lipídicas en células vivas por lo general no han tenido éxito, lo que puede significar que tales balsas no existen, o son tan pequeñas (de 5 a 25 nm de diámetro) y de corta vida como para ser difíciles de detectar con las técnicas actuales. El concepto de balsas lipídicas es muy atractivo, porque proporciona un medio para introducir orden en un mar aparentemente aleatorio de moléculas de lípidos. Se postula que las balsas lipídicas sirven como plataformas flotantes para concentrar proteínas específicas, lo cual organiza la membrana en compartimientos funcionales (obsérvese figura 4-24*b*). Por ejemplo, se cree que las balsas lipídicas proporcionan un entorno local favorable para que los receptores de la superficie celular interactúen con otras proteínas de membrana, que transmiten señales desde el espacio extracelular hasta el interior de la célula.

## REPASO

1. ¿Cuál es la importancia de la insaturación de ácidos grasos para la fluidez de la membrana? ¿Cuál es la de las enzimas que son capaces de desaturar ácidos grasos?
2. ¿Qué significa la temperatura de transición de una membrana, y cómo se ve afectada por el grado de saturación o la longitud de las cadenas de acilo graso? ¿Cuál es la importancia de estas propiedades en la formación de balsas lipídicas?
3. ¿Por qué la fluidez de la membrana es importante para una célula?
4. ¿Cómo es posible que las dos caras de una bicapa lipídica tengan diferentes cargas iónicas?

## 4.7 Naturaleza dinámica de la membrana plasmática

Es evidente a partir de la discusión previa que la bicapa lipídica puede existir en un estado relativamente fluido. Como resultado, un fosfolípido se puede mover lateralmente dentro de la misma hoja o capa individual con considerable facilidad. La movilidad de las moléculas de lípidos individuales dentro de la bicapa de la membrana plasmática se puede observar directamente bajo el microscopio, al unir las cabezas polares de los lípidos a partículas de oro o compuestos fluorescentes (véase figura 4-29). Se estima que un fosfolípido se puede difundir desde un extremo de una bacteria hasta el otro extremo en uno o dos segundos. Por el contrario, una molécula de fosfolípidos tarda una cuestión de horas o días en pasar a la otra hoja de la membrana. Por tanto, de todos los movimientos posibles que puede realizar un fosfolípido, su voltereta al otro lado de la membrana es el más restringido (véase **FIGURA 4-25**). Este hallazgo no es sorprendente. Para que ocurra la voltereta el grupo cabeza hidrofílico del lípido debe pasar a través de la lámina hidrofóbica interna de la membrana, que es termodinámicamente desfavorable. Sin embargo, las células contienen enzimas que mueven activamente ciertos fosfolípidos de una capa a la otra. Estas enzimas, conocidas como *flipasas*, desempeñan un papel en el establecimiento de la asimetría de los lípidos.

Debido a que los lípidos proporcionan la matriz en la que están contenidas las proteínas integrales de una membrana, el estado físico del lípido es un determinante importante de la movilidad de las proteínas integrales. La demostración de que las proteínas integrales se pueden mover dentro del plano de la membrana fue una piedra angular en la formulación del modelo del mosaico fluido. Las propiedades dinámicas de las proteínas de membrana se han revelado de varias formas.

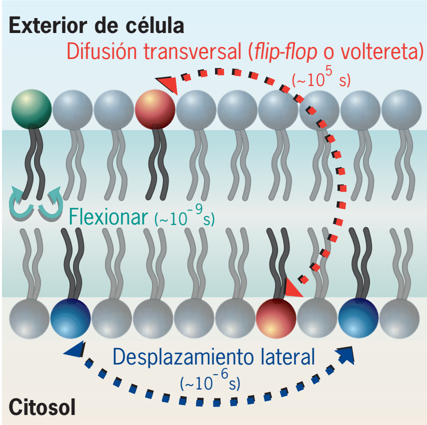



**FIGURA 4-25 Posibles movimientos de los fosfolípidos en una membrana.** Tipos de movimientos en los que pueden participar los fosfolípidos de membrana y escalas temporales aproximadas en las que ocurren. Mientras que los fosfolípidos se mueven de una capa a otra a un ritmo muy lento, se difunden lateralmente dentro de una capa con rapidez. Los lípidos que carecen de grupos polares, como el colesterol, se pueden mover a través de la bicapa con bastante rapidez.

## Difusión de las proteínas de membrana tras la fusión celular

La **fusión celular** es una técnica mediante la cual dos tipos diferentes de células, o células de dos especies diferentes, se pueden fusionar para producir una célula con un citoplasma común y una sola membrana plasmática continua. Se induce a las células a fusionarse al hacer que su superficie exterior sea "pegajosa", de modo que sus membranas plasmáticas se adhieran entre ellas. Se puede inducir la fusión de las células mediante la adición de ciertos virus inactivos que se adhieren a la membrana de la superficie, mediante la adición polietilenglicol compuesto, o mediante una descarga eléctrica leve. La fusión celular ha desempeñado un papel importante en la biología celular, y en la actualidad se usa en una técnica muy útil para preparar anticuerpos específicos (véase sección 18.26).

Los primeros experimentos para demostrar que las proteínas de la membrana se podían mover dentro del plano de la membrana utilizaban la fusión celular; Larry Frye y Michael Edidin, de la Universidad Johns Hopkins, lo informaron en 1970. En sus experimentos se fusionaron células de ratón y humanas, y se siguió la ubicación de proteínas específicas de la membrana plasmática una vez que las dos membranas se volvieron continuas. Para seguir la distribución de las proteínas de membrana de ratón, o las proteínas de membrana humana en diferentes momentos después de la fusión, se prepararon anticuerpos para uno u otro tipo de proteínas y se unieron en forma covalente a colorantes fluorescentes. Los anticuerpos contra las proteínas del ratón se unieron en complejos con un pigmento de fluorescencia verde y los anticuerpos contra las proteínas humanas con uno de fluorescencia roja. Cuando los anticuerpos se añadieron a las células fusionadas se unieron a las proteínas humanas o de ratón, y pudieron localizarse bajo un microscopio óptico de fluorescencia (consúltese figura 4-26*a*). En el momento de la fusión la membrana plasmática parecía mitad humana y mitad ratón; es decir, los dos tipos de proteínas permanecieron segregados en su propia esfera (paso 3, véase figura 4-26*a*), *b*). A medida que aumentaba el tiempo después de la fusión, se observó que las proteínas de membrana se movían lateralmente dentro de la membrana hacia el hemisferio opuesto. En aproximadamente 40 minutos, las proteínas de cada especie se distribuyeron uniformemente alrededor de la membrana celular híbrida completa (paso 4, véase figura 4-26*a*). Si el mismo experimento se realizaba a temperatura más baja, la viscosidad de la bicapa lipídica aumentaba, y la movilidad de las proteínas de la membrana disminuía. Estos primeros experimentos de fusión celular dieron la impresión de que las proteínas integrales de la membrana eran capaces de movimientos virtualmente ilimitados. Como veremos en breve, los estudios posteriores pusieron de manifiesto que la dinámica de la membrana era un tema mucho más complejo de lo que se había previsto inicialmente.

## Restricciones sobre la proteína y la movilidad de los lípidos

Varias técnicas permiten a los investigadores seguir los movimientos de las moléculas en las membranas de las células vivas utilizando el microscopio óptico. En una técnica llamada **recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueado (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*)** ilustrada en la **FIGURA 4-27*a*)**, los componentes integrales de membrana en células cultivadas se marcan primero mediante la unión a un colorante fluorescente. Una proteína particular de membrana se puede marcar con una sonda específica, como un anticuerpo

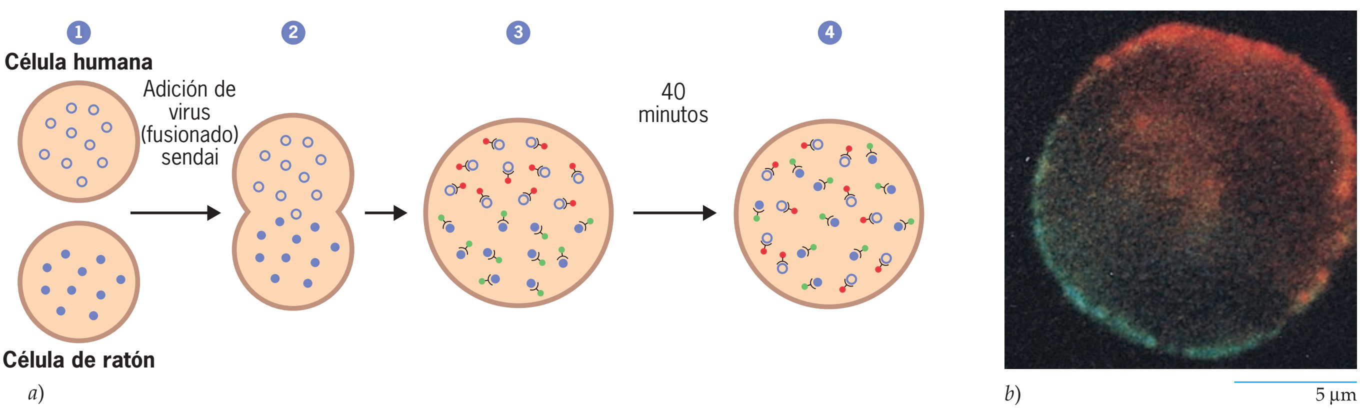



**FIGURA 4-26 El uso de la fusión celular para revelar la movilidad de las proteínas de membrana.** *a*) Esquema del experimento en el que se fusionaron células humanas y de ratón (pasos 1-2), y en los híbridos se siguió la distribución de las proteínas en la superficie de cada célula a lo largo del tiempo (etapas 3-4). Las proteínas de la membrana del ratón se indican por círculos de color entero; las proteínas de la membrana humana por círculos claros. Las localizaciones de las proteínas humanas y de ratón en las membranas plasmáticas de las células híbridas se controlaron por interacción con anticuerpos fluorescentes rojos y verdes, respectivamente. *b*) Micrografía que muestra una célula fusionada donde las proteínas humanas y de ratón aún están en sus respectivos hemisferios (equivalentes al híbrido en el paso 3 de la parte *a*).

FUENTE: *b*) De LD Frye y Michael Edidin, *J Cell Science* 1970;7:328-334, con permiso de la compañía Biologists, Ltd. Cortesía de Michael Edidin, Universidad Johns Hopkins. http://jcs.biologists.org/content/7/2/319 full.pdf+html?sid=d93ae648-abca-4f5d-90a6- a6d9726d7d30.

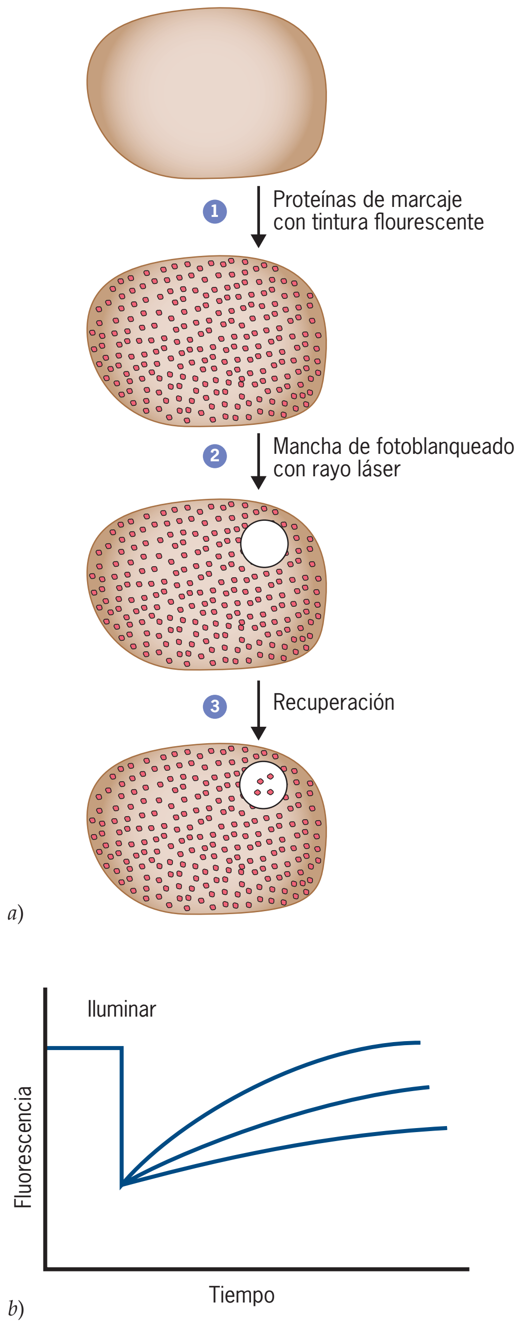



**FIGURA 4.27 Medición de las velocidades de difusión de las proteínas de membrana por recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado (FRAP).** *a*) En esta técnica, un componente particular de la membrana se marca primero con un colorante fluorescente (fase 1). Luego se radia una pequeña región de la superficie para blanquear las moléculas de colorante (fase 2) y después de un tiempo, se recupera la fluorescencia en la región blanqueada (fase 3). *b*) La velocidad de recuperación de la fluorescencia en la mancha iluminada varía según la(s) proteína(s) que se siga(n). La velocidad de recuperación está relacionada con el coeficiente de difusión de la proteína con marca fluorescente.e.

fluorescente. Una vez marcadas, las células se colocan bajo el microscopio y se irradian mediante un rayo láser enfocado, que blanquea las moléculas fluorescentes en su trayectoria y deja una mancha circular desprovista de fluorescencia (de aproximadamente 1 μm de diámetro típico) en la superficie de la célula. Si las proteínas etiquetadas en la membrana son móviles, los movimientos aleatorios de estas moléculas deberían producir una reaparición gradual de fluorescencia en el círculo irradiado. La velocidad de recuperación de la fluorescencia (véase figura 4-27*b*) proporciona una medida directa de la velocidad de difusión (expresada como coeficiente de difusión, *D*) de las moléculas móviles. El grado de recuperación de la fluorescencia (expresado como porcentaje de la intensidad original) proporciona una medida del porcentaje de las moléculas marcadas que se difunden libremente.

Los primeros estudios que utilizaron la FRAP sugirieron que 1) las proteínas de membrana se movían mucho más lentamente en la membrana plasmática de las células vivas que en una bicapa lipídica pura y 2) una fracción significativa de proteínas de membrana (30 a 70%) no estaba libre para difundir de regreso al círculo irradiado. Pero la técnica FRAP tiene sus inconvenientes. La FRAP solo puede seguir el movimiento promedio de un número relativamente grande de moléculas marcadas (de cientos a miles) a medida que se difunden a una distancia relativamente grande (p. ej., 1 μm). Como resultado, los investigadores que usan FRAP no pueden distinguir entre las proteínas que son realmente inmóviles y las que solo pueden difundirse a una distancia limitada en el tiempo permitido. Para evitar estas limitaciones, se han desarrollado técnicas alternativas que les permiten a los investigadores observar movimientos de las moléculas de proteínas individuales en distancias muy cortas, y determinar cómo podrían ser sujetadas.

En el **rastreo de partículas individuales (SPT, *single-particle tracking*)**, las moléculas individuales de proteína de membrana están marcadas, por lo general, con etiquetas moleculares fluorescentes que emiten luz bajo un microscopio. Los movimientos de las moléculas marcadas se siguen con un tipo de microscopia conocida como TIRF (fluorescencia de reflexión total interna) que está especializada en obtener imágenes de moléculas fluorescentes en la superficie de las células. Los resultados de estos estudios dependen a menudo de la proteína particular que se está investigando. Por ejemplo,

- Algunas proteínas de membrana se mueven aleatoriamente a través de la membrana (obsérvese figura 4-28, proteína A), aunque por lo general a velocidades considerablemente menores que las que se medirían en una bicapa lipídica artificial. (Si la movilidad proteica se basara estrictamente en parámetros físicos como la viscosidad lipídica y el tamaño de proteína, se esperaría que las proteínas migraran con coeficientes de difusión de aproximadamente $10^{-8}$ a $10^{-9}$ $cm^2/s$ en lugar de $10^{-10}$ a $10^{-12}$ $cm^2/s$, como se observa en las moléculas de este grupo). Han sido objeto de debate las razones para el coeficiente de difusión reducido.
- Algunas proteínas de membrana no se mueven y se consideran inmovilizadas (consúltese figura 4-28, proteína B).
- En algunos casos se encuentra que una proteína se mueve de una manera altamente direccionada (es decir, no aleatoria) hacia una parte u otra de la célula (véase figura 4-28, proteína C). Por ejemplo, una proteína de membrana particular puede tender a moverse hacia el borde anterior o posterior de una célula en movimiento.
- En casi todos los estudios, la mayor parte de las especies de proteínas muestra un movimiento aleatorio (browniano) dentro de la membrana, a velocidades compatibles con la difusión libre (coeficientes de difusión de aproximadamente $5 \times 10^{-9}$ $cm^2/s$), pero las moléculas no pueden migrar libremente por más de algunas décimas de micrómetro. La difusión de largo alcance ocurre, pero a velocidades más lentas, aparentemente debido a la presencia de un sistema de barreras. Estas barreras se discuten en las siguientes secciones.

**CONTROL DE LA MOVILIDAD DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA** Es evidente que las proteínas de la membrana plasmática no son totalmente libres para vagar al azar en el "mar" lipídico. En cambio, esta clase de proteínas está sujeta a

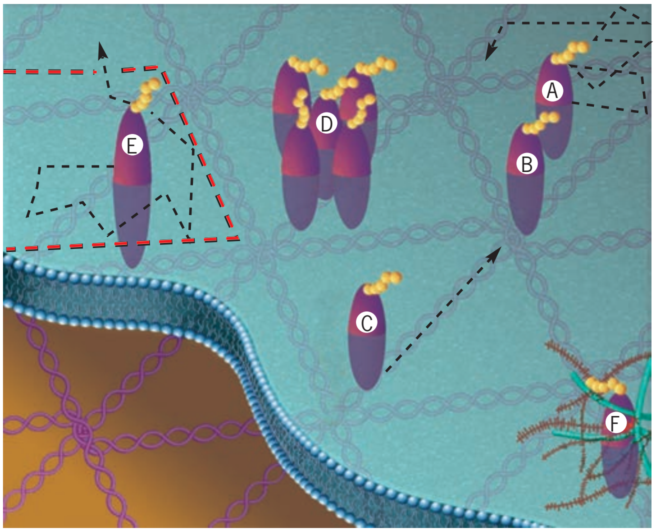



**FIGURA 4-28 Patrones de movimiento de proteínas integrales de membrana.** En dependencia del tipo de célula y las condiciones, las proteínas integrales de membrana pueden exhibir varios tipos diferentes de movilidad. La proteína A es capaz de difundirse aleatoriamente por toda la membrana, aunque su velocidad de movimiento puede ser limitada; la proteína B se inmoviliza como resultado de su interacción con el esqueleto de la membrana subyacente; la proteína C se mueve en una dirección particular como resultado de su interacción con una proteína motora en la superficie citoplásmica de la membrana; el movimiento de la proteína D está restringido por otras proteínas integrales de membrana; el movimiento de la proteína E está restringido por vallas formadas por proteínas del esqueleto de la membrana, pero puede saltar a compartimientos adyacentes a través de aberturas transitorias en una valla; el movimiento de la proteína F está restringido por materiales extracelulares.

diversas influencias que afectan su movilidad, y al hacerlo promueven la organización intramembrana. Algunas membranas están llenas de proteínas, por lo que los movimientos aleatorios de una molécula se pueden ver impedidos por sus vecinos (véase **FIGURA 4-28**, proteína D).

Se cree que las influencias más fuertes sobre una proteína de membrana integral se ejercen justo debajo de la membrana sobre su cara citoplásmica. Las membranas plasmáticas de muchas células poseen una red fibrilar, o "esqueleto de membrana", que consiste en proteínas periféricas situadas en la superficie citoplásmica de la membrana. Una cierta proporción de moléculas de proteínas integrales de membrana están unidas al esqueleto de la membrana (consúltese figura 4-28, proteína B) o están restringidas por este.

La información concerniente a la presencia de barreras de membrana se ha obtenido mediante una técnica innovadora, que permite a los investigadores atrapar proteínas integrales y arrastrarlas a través de la membrana plasmática con una fuerza determinada. Esta técnica, que utiliza un aparato conocido como *pinzas ópticas*, aprovecha las pequeñas fuerzas ópticas que se generan mediante un rayo láser enfocado. Las proteínas integrales que se estudiarán se etiquetan con cuentas recubiertas de anticuerpos, que sirven como asas que pueden ser agarradas por el rayo láser. En general, se encuentra que las pinzas ópticas pueden arrastrar una proteína integral durante una distancia limitada, antes de que la proteína encuentre una barrera que haga que se libere del agarre del láser. A medida que se libera la proteína normalmente retrocede, lo que sugiere que las barreras son estructuras elásticas.

Un enfoque para estudiar los factores que afectan la movilidad de la proteína de la membrana es modificar genéticamente las células para que produzcan proteínas de membrana alteradas. Las proteínas integrales cuyas porciones citoplásmicas han sido genéticamente eliminadas, a menudo se mueven *distancias* mucho mayores que sus contrapartes intactas, lo que indica que las barreras residen en el lado citoplásmico de la membrana. Estos hallazgos sugieren que el esqueleto subyacente de la membrana forma una red de "vallas" alrededor de las porciones de la membrana, que crea compartimientos que restringen la distancia que puede recorrer una proteína integral (véase figura 4-28, proteína E). Las proteínas se mueven a través de los límites de un compartimiento a otro por interrupciones en las vallas. Se piensa que tales aberturas aparecen y desaparecen junto con el desmontaje dinámico y el montaje de partes de la valla. Los compartimientos de membrana pueden mantener combinaciones específicas de proteínas lo bastante cerca como para facilitar su interacción.

Las proteínas integrales que carecen de la porción que normalmente se proyectaría en el espacio extracelular se mueven a una *velocidad* mucho mayor que la versión de la proteína tipo salvaje. Este hallazgo sugiere que el movimiento de una proteína transmembrana a través de la bicapa se ralentiza con materiales extracelulares, que pueden enredar la porción externa de la molécula de proteína (véase figura 4-28, proteína F).

## MOVILIDAD DE LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA

Las proteínas son moléculas grandes, por lo que no es sorprendente que su movimiento dentro de la bicapa lipídica se vea restringido. En comparación, los fosfolípidos son moléculas pequeñas que conforman el propio tejido de la bicapa lipídica. Podría esperarse que sus movimientos fueran completamente libres; sin embargo, varios estudios han sugerido que la difusión de fosfolípidos también está restringida. Cuando las moléculas de

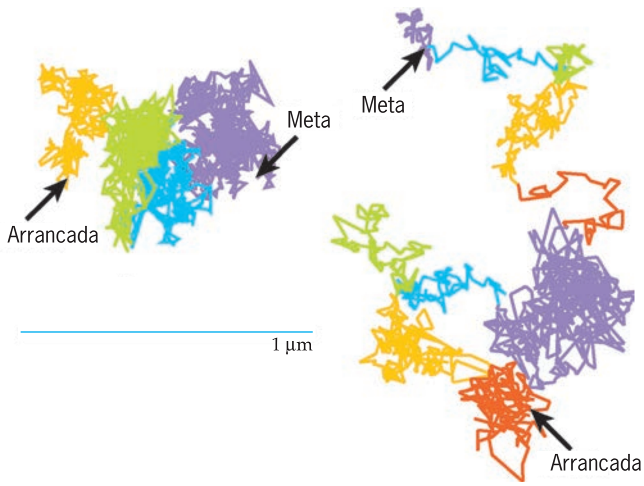



**FIGURA 4-29 Demostración experimental de que la difusión de fosfolípidos dentro de la membrana plasmática está confinada.** *a*) Se sigue la trayectoria de un único fosfolípido insaturado marcado durante 56 ms, a medida que se difunde dentro de la membrana plasmática de un fibroblasto de rata. Los fosfolípidos se difunden libremente dentro de un compartimiento confinado antes de saltar a un compartimiento vecino. La velocidad de difusión dentro de un compartimiento es tan rápida como la esperada por el movimiento browniano sin impedimentos. Sin embargo, la tasa global de difusión del fosfolípido parece disminuir, debido a que la molécula debe saltar una barrera para continuar su movimiento. El movimiento del fosfolípido dentro de cada compartimiento está representado por un solo color. *b*) El mismo experimento que se muestra en *a*) se lleva a cabo durante 33 ms en una bicapa artificial, que carece de las "cercas de estacas" presentes en una membrana celular. La trayectoria mucho más abierta y extendida del fosfolípido se puede explicar ahora por un movimiento browniano simple e ilimitado. En aras de la comparación, los compartimientos falsos se asignaron en *b*) y se indicaron con diferentes colores.

FUENTE: De Takahiro Fujiwara, *et al*. Cortesía de Akihiro Kusumi, Nagoya, *J Cell Biol* 2002;157:1073; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

fosfolípidos individuales de una membrana plasmática son marcadas y seguidas bajo el microscopio, mediante cámaras de velocidad ultra alta, se las ve confinadas por periodos muy breves y luego saltan de un área confinada a otra. La **FIGURA 4-29*a*)** muestra el camino tomado por un fosfolípido individual dentro de la membrana plasmática, durante un periodo de 56 milisegundos. El análisis por computadora indica que el fosfolípido se difunde libremente dentro de un compartimiento (sombreado en púrpura) antes de saltar la "valla" hacia un compartimiento vecino (sombreado en azul), y luego sobre otra cerca en un compartimiento adyacente (sombreado en verde), y así sucesivamente. El tratamiento de la membrana con agentes que interrumpen el esqueleto de membrana subyacente elimina algunas de las vallas que restringen la difusión de fosfolípidos. Pero si el esqueleto de la membrana se encuentra debajo de la bicapa lipídica, ¿cómo puede interferir con el movimiento de los fosfolípidos? Los autores de estos estudios especulan que las vallas están construidas con hileras de proteínas integrales de membrana, cuyos dominios citoplásmicos están unidos al esqueleto de la membrana. Esto no es diferente al confinamiento de caballos o vacas por una valla de estacas cuyos postes están incrustados en el suelo subyacente.

**DOMINIOS DE MEMBRANA Y POLARIDAD CELULAR** En su mayor parte los estudios de la dinámica de la membrana —como los discutidos anteriormente— se llevan a cabo en la membrana plasmática, relativamente homogénea, situada en la superficie superior o inferior de una célula que reside en un plato de cultivo. Sin embargo, la mayoría de las membranas exhiben variaciones en la composición y movilidad de las proteínas, especialmente en células cuyas diversas superficies exhiben diferentes funciones. Por ejemplo, las células epiteliales que recubren la pared intestinal, o constituyen los túbulos microscópicos del neonato, son células altamente polarizadas cuyas diferentes superficies llevan a cabo distintas funciones (consúltese **FIGURA 4-30**). Los estudios indican que la membrana plasmática apical, que absorbe selectivamente sustancias del lumen, posee enzimas diferentes a las de la membrana plasmática lateral, que interactúa con las células epiteliales vecinas, o la membrana basal, que se adhiere a un sustrato extracelular subyacente (una *membrana de cimentación*). En otros ejemplos, los receptores para sustancias neurotransmisoras se concentran en regiones de la membrana plasmática ubicadas dentro de las sinapsis (obsérvese figura 4-57), y los receptores para lipoproteínas de baja densidad se concentran en parches de la membrana plasmática especializados para facilitar su internalización (obsérvese figura 8-38).

De todos los diversos tipos de células de mamíferos, los espermatozoides pueden tener la estructura más altamente diferenciada. Un espermatozoide maduro se puede dividir en cabeza, pieza intermedia y cola, cada una con sus propias funciones especializadas. Aunque está dividido en varias partes distintas, un espermatozoide está cubierto por una membrana plasmática *continua*, que según revelan numerosas técnicas consiste en un mosaico de diferentes tipos de dominios localizados. Por ejemplo, cuando los espermatozoides se tratan con una variedad de anticuerpos, cada anticuerpo se combina con la superficie de la célula en un patrón topográfico único, que refleja la distribución dentro de la membrana plasmática del antígeno de proteína particular reconocido por ese anticuerpo (véase **FIGURA 4-31**).

## REPASO

1. Describa dos técnicas para medir las velocidades de difusión de una proteína de membrana específica.
2. Compare y contraste los tipos de movilidad de proteínas representados en la figura 4-28.
3. Compare la velocidad de difusión lateral de un lípido con el *flip-flop* (voltereta). ¿Cuál es el motivo de la diferencia?

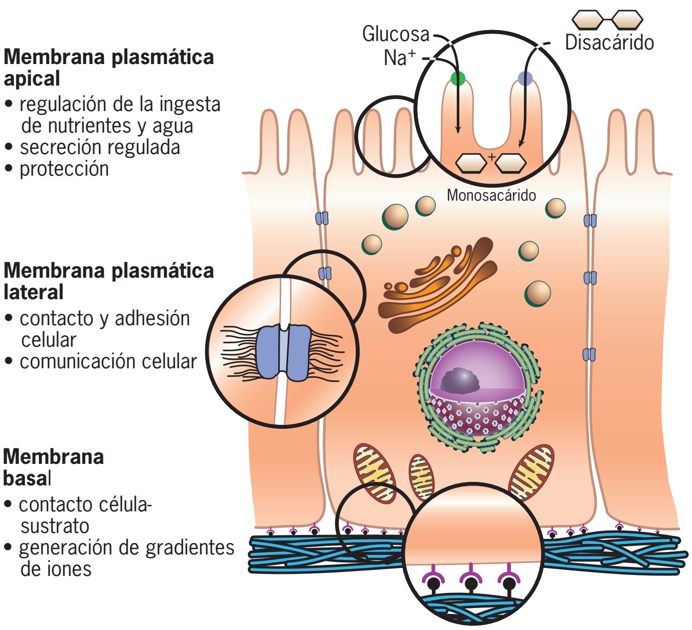



**FIGURA 4-30 Funciones diferenciadas de la membrana plasmática de una célula epitelial.** La superficie apical de esta célula epitelial intestinal contiene proteínas integrales que funcionan en el transporte de iones y la hidrólisis de disacáridos como la sacarosa y lactosa; la superficie lateral contiene proteínas integrales que funcionan en la interacción intercelular, y la superficie basal contiene proteínas integrales que funcionan en la asociación de la célula con la membrana basal subyacente.

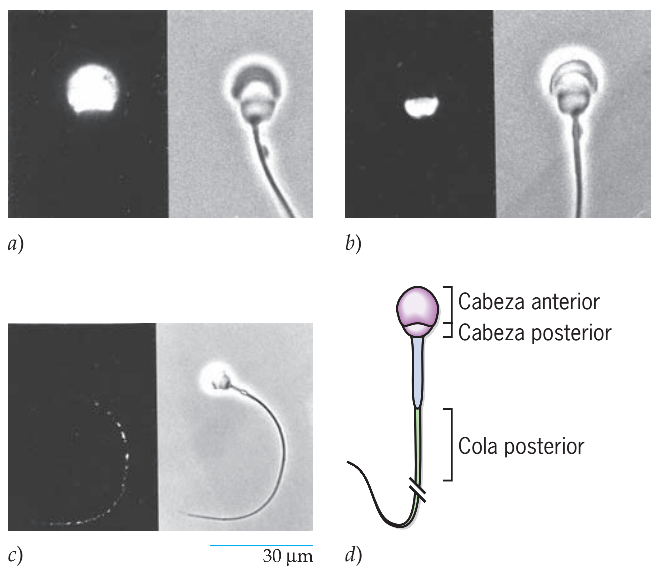



**FIGURA 4-31 Diferenciación de la membrana plasmática del espermatozoide de mamífero revelada por anticuerpos fluorescentes.** *a-c*) Tres pares de micrografías, cada una de las cuales muestra la distribución de una proteína particular en la superficie celular, como se revela por un anticuerpo fluorescente unido. Las tres proteínas están localizadas en diferentes partes de la membrana espermática continua. Cada par de fotografías muestra el patrón de fluorescencia del anticuerpo unido, y una micrografía de contraste de fase de la misma célula. *d*) Diagrama que resume la distribución de las proteínas.

FUENTE: *a-c*) de Diana G. Myles, Paul Primakoff y Anthony R. Bellvé. *Cell* 1981;23:434, © con permiso de Elsevier.

## 4.8 El glóbulo rojo: un ejemplo de estructura de membrana plasmática

De todos los diversos tipos de membranas, la membrana plasmática del eritrocito humano (glóbulo rojo) es la más estudiada y mejor entendida (véase **FIGURA 4-32*a***). Hay varias razones para la popularidad de esta membrana. Estas células son económicas de obtener y están disponibles en grandes cantidades a partir de la sangre completa. Ya están presentes como células individuales y no necesitan disociarse de un tejido complejo. Las células son simples en comparación con otros tipos de células, y carecen de membranas nucleares y citoplásmicas que inevitablemente contaminan las preparaciones de la membrana plasmática de otras células. Además, pueden obtenerse membranas plasmáticas de eritrocito purificadas, *intactas* tan solo con colocar las células en una solución salina diluida (hipotónica). Las células responden a este choque osmótico absorbiendo agua y expandiéndose, un fenómeno denominado *hemólisis*. A medida que aumenta el área de superficie de cada célula, la célula pierde agua y el contenido, compuesto casi por completo de hemoglobina disuelta, fluye fuera de la célula y deja una membrana plasmática "fantasma" (consúltese figura 4-32*b*).

Una vez aisladas las membranas plasmáticas de los eritrocitos, las proteínas se pueden solubilizar y separarse unas de otras (fraccionarse), lo que proporciona una mejor idea de la diversidad de proteínas dentro de la membrana. El fraccionamiento de las proteínas de membrana se puede llevar a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*), en presencia del detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*). (La técnica de SDS-PAGE se trata en la sección 18.13). La SDS mantiene las proteínas integrales solubles, y además agrega un gran número de cargas negativas a las proteínas con las que se asocia. Debido a que el número de moléculas de SDS cargadas por unidad de peso de proteína tiende a ser relativamente constante, las moléculas se separan unas de otras de acuerdo con su peso molecular. Las proteínas más grandes se mueven más lentamente a través del tamiz molecular del gel. Las principales proteínas de la membrana de eritrocitos se separan por SDS-PAGE en aproximadamente una docena de bandas llamativas (véase figura 4-32*c*). Entre las proteínas hay una variedad de enzimas (que incluyen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, una de las enzimas de la glucólisis), proteínas de transporte (para iones y azúcares) y proteínas esqueléticas (p. ej., la espectrina).

### Proteínas integrales de la membrana de eritrocitos

En la figura 4-32*d*) se observa un modelo de membrana plasmática de eritrocitos que muestra sus principales proteínas. Las proteínas integrales más abundantes de esta membrana son un par de proteínas que atraviesan la membrana y que contienen carbohidratos, llamadas banda 3 y glicoforina A. La alta densidad de estas proteínas dentro de la membrana se aprecia en las micrografías de fractura por congelación de la figura 4-15. La banda 3, que recibe su nombre de su posición en un gel electroforético (obsérvese figura 4-32*c*), está presente como un dímero compuesto por dos subunidades idénticas (un *homodímero*). Cada subunidad abarca la membrana al menos una docena de veces, y contiene una cantidad relativamente pequeña de carbohidratos (6-8% en peso de la molécula). La proteína banda 3 sirve como un canal para el intercambio pasivo de aniones a través de la membrana. A medida que la sangre circula por los tejidos, el dióxido de carbono se disuelve en el líquido del torrente sanguíneo (el plasma) y se somete a la siguiente reacción:

$$H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$$

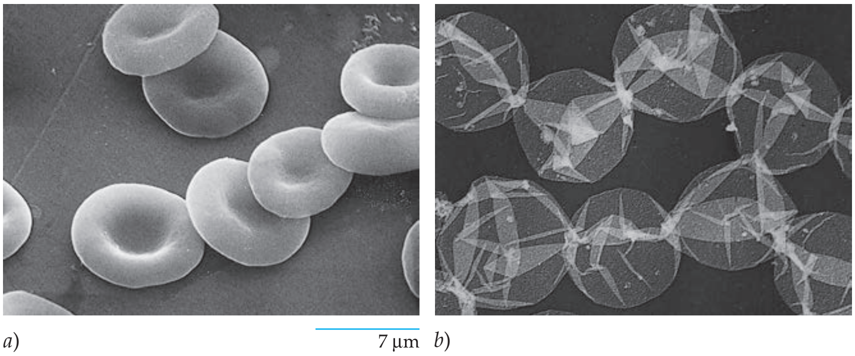
Los iones de bicarbonato ($HCO_3^-$) entran en el eritrocito en intercambio con iones cloruro, que salen de la célula. En los pulmones —donde se libera el dióxido de carbono— la reacción se invierte, y los iones de bicarbonato salen del eritrocito a cambio de iones cloruro. El movimiento recíproco del $HCO_3^-$ y el $Cl^-$ tiene lugar a través de un canal en el centro de cada dímero de la banda 3.

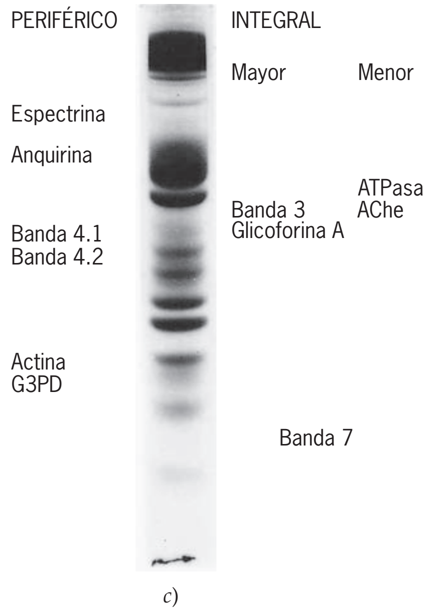
La glicoforina A fue la primera proteína de membrana en tener determinada su secuencia de aminoácidos. La disposición de la cadena polipeptídica de la glicoforina A dentro de la membrana plasmática se muestra en la figura 4-18. (Otras glicoforinas relacionadas, B, C, D y E, también están presentes en la membrana, a concentraciones mucho más bajas). Al igual que la banda 3, la glicoforina A también está presente en la membrana como un dímero. A diferencia de la banda 3, cada subunidad de glicoforina A atraviesa la membrana solo una vez, y contiene una cubierta espesa de carbohidratos que consiste en 16 cadenas oligosacáridas, que juntas representan aproximadamente 60% del peso de la molécula. Se cree que la función principal de la glicoforina proviene del gran número de cargas negativas que se producen en el ácido siálico, el residuo de azúcar al final de cada cadena de carbohidratos. Debido a estas cargas, los glóbulos rojos se repelen entre sí, lo que impide que las células se agrupen a medida que circulan a través de los pequeños vasos del cuerpo. Es digno de mención que las personas que carecen tanto de glicoforina A como de B en sus glóbulos rojos no muestran efectos negativos de su ausencia. Al mismo tiempo, las proteínas de la banda 3 en estos individuos están más fuertemente glucosiladas, lo que aparentemente compensa las cargas negativas que de otro modo faltaban para evitar la interacción célula-célula. La glicoforina también es el receptor utilizado por el protozoo que causa la malaria, al proporcionar un camino para la entrada a la célula sanguínea. En consecuencia, se cree que los individuos cuyos eritrocitos carecen de glicoforina A y B están protegidos contra la malaria.

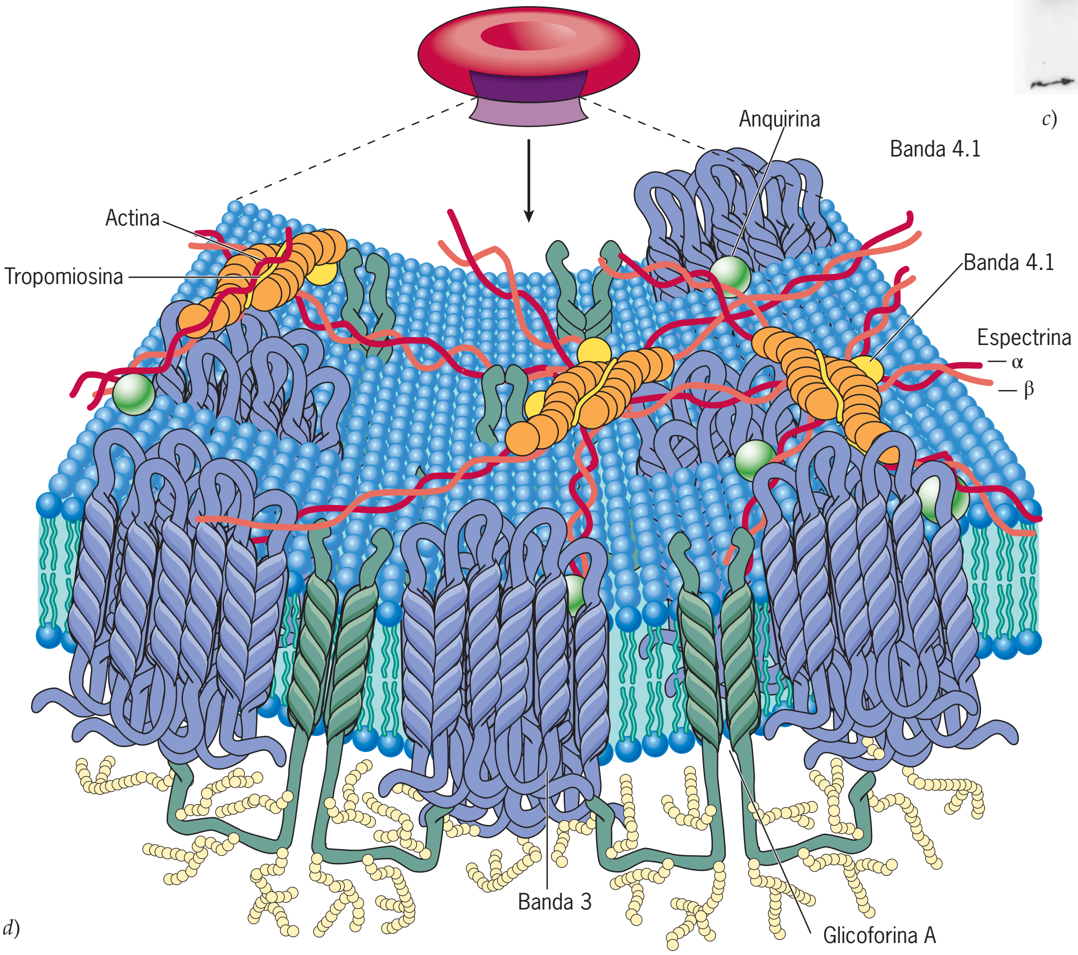
### El esqueleto de la membrana del eritrocito

La membrana plasmática de los eritrocitos está soportada por un esqueleto fibrilar compuesto de proteínas periféricas de membrana (véase figura 4-32*d*, *e*), que desempeña un papel principal en la determinación de la forma bicóncava del eritrocito. Como se discutió en la página 135, el esqueleto de membrana puede establecer, dentro de esta, dominios que encierran grupos particulares de proteínas de membrana, y puede restringir en gran medida el movimiento de estas proteínas. El componente principal del esqueleto es una proteína fibrosa alargada, llamada *espectrina*. La espectrina es un heterodímero de aproximadamente 100 nm de longitud que consta de subunidades a y b, curvadas una alrededor de la otra. Dos de estas moléculas diméricas están unidas en sus extremos superiores para formar un filamento de 200 nm que es tan flexible como elástico. La espectrina se une a la superficie interna de la membrana —mediante enlaces no covalentes— a otra proteína periférica, la *anquirina* (las esferas verdes de la figura 4-32), que a su vez está unida en forma no covalente al dominio citoplásmico de una molécula de la banda 3. Como es evidente en las figuras 4-32*d* y *e*), los filamentos de espectrina están organizados en matrices hexagonales o pentagonales. Esta red bidimensional se construye uniendo ambos extremos de cada filamento de espectrina a un grupo de proteínas que incluye filamentos cortos de *actina* y *tropomiosina*, proteínas que suelen participar en actividades contráctiles (véase capítulo 9). Varias enfermedades genéticas (*anemias hemolíticas*) caracterizadas por eritrocitos frágiles y de forma anormal se han remontado a mutaciones en anquirina o espectrina.

Si las proteínas periféricas se eliminan del "fantasma de eritrocito", la membrana se fragmenta en vesículas pequeñas, lo que indica que la red interna de proteínas es necesaria para mantener la integridad de la membrana. Los eritrocitos son células circulan-



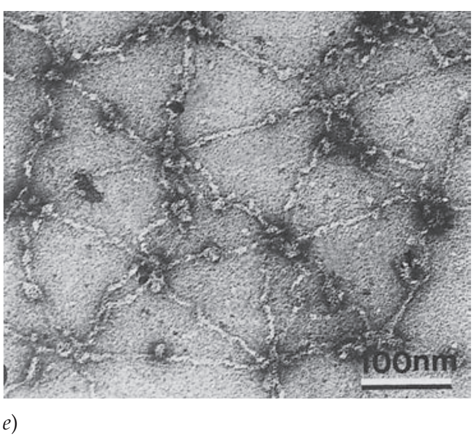




**FIGURA 4-32 Membrana plasmática del eritrocito humano.** *a*) Micrografía electrónica de barrido de eritrocitos humanos. *b*) Micrografía que muestra los "fantasmas de membrana" en el plasma, que se aislaron al permitir que los eritrocitos se hinchen y se hemolicen como se describe en el texto. *c*) Resultados de la electroforesis en el gel de la SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizada para fraccionar las proteínas de membrana de eritrocitos, que se identifican a los lados del gel. *d*) Un modelo de la membrana plasmática de los eritrocitos visto desde la superficie interna, que muestra las proteínas integrales impregnadas en la bicapa lipídica y la disposición de las proteínas periféricas que conforman el esqueleto interno de la membrana. El dímero de banda 3 que se muestra aquí está simplificado. La proteína de la banda 4.1 estabiliza los complejos actina-espectrina. e) Microfotografía electrónica que muestra la disposición de las proteínas del esqueleto de la membrana interna.

FUENTE: *a*) Cortesía de François M. M. Morel, Richard F. Baker y Harold Wayland, reproducida con permiso de The Rockefeller University Press; *b*) Cortesía de Joseph F. Hoffman; *c*) De V. T. Marchesi, H. Furthmayr, y M. Tomita. *Annu Rev Biochem* vol. 45; © 1976 por Annual Reviews Inc; *d*) Por D. Voet y J. G. Voet, *Biochemistry*, 2ª ed.; Copyright ©1995, John Wiley & Sons, Inc.; e) De Shih-Chun Liu, Laura H. Derick, y Jiri Palek, *J Cell Biol* 1987;104:527, reproducido con permiso de The Rockefeller University Press.

tes que se comprimen bajo presión a través de capilares microscópicos, cuyo diámetro es considerablemente menor que el de los propios eritrocitos. Para atravesar estos pasillos angostos, y para hacerlo día tras día, los glóbulos rojos deben ser altamente deformables, duraderos y capaces de resistir las fuerzas en cizalla que tienden a romperlo. La red actuante de actina-espectrina proporciona a la célula la fuerza, la elasticidad y la flexibilidad necesarias para llevar a cabo su exigente función.

Cuando se descubrió por primera vez, se pensó que el esqueleto de la membrana del eritrocito era una estructura única, adecuada a la forma única y las necesidades mecánicas de este tipo de célula. Sin embargo, a medida que se examinaron otras células, se han descubierto tipos similares de esqueletos de membrana que contienen miembros de las familias de espectrina y anquirina, lo que indica que los esqueletos de la membrana interna están muy extendidos. La distrofina, por ejemplo, es un miembro de la familia de espectrinas que se encuentra en el esqueleto de membrana de las células musculares. Las mutaciones en la distrofina son responsables de causar la distrofia muscular, una enfermedad devastadora que paraliza y mata a los niños. Las mutaciones más debilitantes son las que conducen a una ausencia completa de la proteína en la célula. Las membranas plasmáticas de las células musculares que carecen de distrofina al parecer se destruyen como consecuencia del estrés mecánico ejercido sobre ellas a medida que el músculo se contrae. Como resultado, las células musculares mueren, y finalmente ya no se reemplazan.

**REPASO**

1. Comente dos funciones principales de las proteínas integrales y periféricas de la membrana eritrocítica.

## 4.9 Movimiento de solutos a través de las membranas celulares

Debido a que los contenidos de una célula están completamente rodeados por su membrana plasmática, toda la comunicación entre la célula y el medio extracelular debe estar mediada por esta estructura. La membrana plasmática es una barrera que retiene los materiales disueltos de la célula para que no se filtren al medio ambiente; sin embargo, debe permitir el intercambio de materiales necesarios dentro y fuera de la célula. La bicapa de lípidos de la membrana es ideal para evitar la pérdida de solutos cargados y polares de una célula. En consecuencia, se debe hacer alguna provisión especial para permitir el movimiento de nutrientes, iones, productos de desecho y otros compuestos, dentro y fuera de la célula. Básicamente, existen dos medios para el movimiento de sustancias a través de una membrana: pasivamente por difusión, o activamente por un proceso de transporte acoplado a la energía. Ambos tipos de movimientos conducen al flujo neto de un ion o compuesto en particular. El término *flujo neto* indica que el movimiento de la sustancia hacia la célula (*afluencia*) y fuera de la célula (*eflujo*) no está equilibrado, sino que uno excede al otro.

Se conocen cuatro procesos diferentes por los cuales las sustancias se mueven a través de las membranas: difusión simple a través de la bicapa lipídica; difusión simple a través de un canal acuoso revestido de proteína; difusión facilitada por un transportador de proteínas, y el transporte activo, que requiere una "bomba" de proteínas, impulsadas por energía, capaz de mover sustancias contra el gradiente de concentración (véase **FIGURA 4-33**). Consideraremos cada uno a su vez, pero primero discutiremos la energía del movimiento de solutos.

### Energética del movimiento de solutos

La **difusión** es un proceso espontáneo en el que una sustancia se mueve desde una región de alta concentración a una región de baja concentración, hasta que al final se elimina la diferencia de concentración entre las dos regiones. Como se discutió en el capítulo 3, la difusión depende del movimiento térmico continuo de los solutos, y es un proceso exergónico impulsado por un aumento en la entropía. Las moléculas difusoras individuales no "saben" en qué dirección moverse: una molécula individual tendrá la misma probabilidad de moverse hacia una región de mayor o menor concentración. Pero debido a que hay más moléculas en un volumen dado de una región de alta concentración que en una región de baja concentración, en promedio más moléculas se moverán de regiones de concentración más altas a regiones de concentración más bajas que a la inversa. Restringiremos la siguiente discusión a la difusión de sustancias a través de las membranas.

Para comprender la energía de la difusión, recordemos que el $\Delta G$ depende de qué tan lejos está un estado del equilibrio. En la difusión el equilibrio se alcanza cuando la concentración es igual a ambos lados de la membrana. El cambio de energía libre cuando un soluto sin carga eléctrica (un no electrólito) se difunde a través de una membrana depende de cuán diferente es la concentración en los dos lados de la membrana. Esta diferencia se conoce como gradiente de concentración. La siguiente relación describe el movimiento de un no electrólito hacia *adentro* de la célula:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

$$\Delta G = 2.303\ RT \log_{10} \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

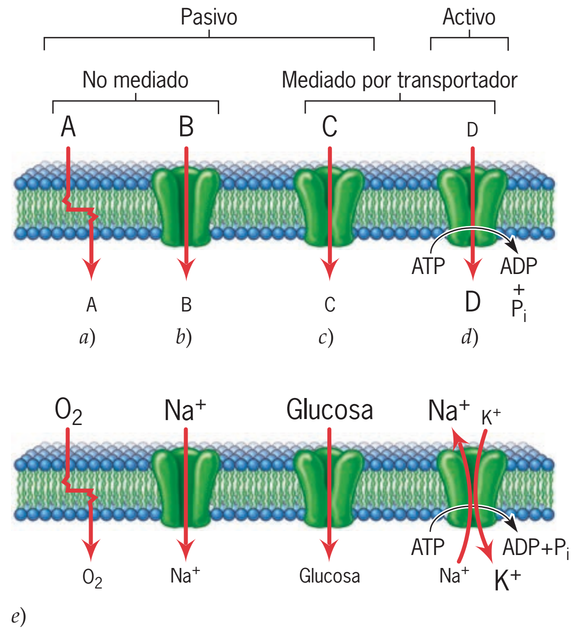



**FIGURA 4-33 Cuatro mecanismos básicos por los cuales las moléculas de soluto se mueven a través de las membranas.** Los tamaños relativos de las letras indican las direcciones de los gradientes de concentración. *a*) Difusión simple a través de la bicapa, que siempre procede de una concentración alta a una baja. *b*) Difusión simple a través de un canal acuoso formado dentro de una proteína de membrana integral, o un grupo de tales proteínas. Como en *a*), el movimiento siempre es hacia abajo de un gradiente de concentración. *c*) Difusión facilitada en la que las moléculas de soluto se unen específicamente a un portador de proteína de membrana (un transportador facilitador). Como en *a*) y *b*), el movimiento siempre es de la alta a la baja concentración. *d*) Transporte activo por medio de un transportador de proteínas, con un sitio de enlace específico que experimenta un cambio en afinidad, potenciado por la energía liberada en un proceso exergónico como la hidrólisis del ATP. El movimiento ocurre contra el gradiente de concentración. *e*) Ejemplos de cada tipo de mecanismo como ocurre en la membrana de un eritrocito.

donde $\Delta G$ es el cambio de energía libre (consúltese sección 3.2), $R$ la constante de los gases, $T$ la temperatura absoluta y $[C_i]/[C_o]$ la relación de la concentración del soluto en las superficies internas (i) y externas (o) de la membrana. A 25 °C,

$$\Delta G = 1.4 \text{ kcal/mol} \cdot \log_{10} \frac{[C_1]}{[C_o]}$$

Resulta claro que si las concentraciones dentro y fuera son iguales, $\Delta G = 0$ y el sistema está en equilibrio. Si la relación $[C_i]/[C_o]$ es menor que 1.0 el logaritmo de la relación será negativo, $\Delta G$ es negativo, y la afluencia neta de soluto se favorece termodinámicamente (exergónica). Por ejemplo, si la concentración externa de soluto es 10 veces la concentración interna, $\Delta G = -1.4$ kcal/mol. Por tanto, mantener un gradiente de concentración de 10 representa un almacenamiento de 1.4 kcal/mol. A medida que el soluto se mueve dentro de la célula el gradiente de concentración disminuye, la energía almacenada se disipa y el $\Delta G$ disminuye hasta que en el equilibrio $\Delta G = 0$. (Para calcular el $\Delta G$ en el movimiento de un soluto hacia fuera de la célula, el término de la relación de concentraciones se convierte en $[C_o]/[C_i]$).

### Formación de un gradiente electroquímico

Si el soluto es un electrólito (una especie cargada), también se debe considerar la diferencia de carga global entre los dos compartimientos. Como resultado de la repulsión mutua de iones de cargas similares, es termodinámicamente desfavorable que un electrólito se mueva a través de una membrana de un compartimiento a otro que tenga una carga neta del mismo signo. Por el contrario, si la carga del electrólito es opuesta en signo a la del compartimiento en que se está moviendo, el proceso se favorece termodinámicamente. Cuanto mayor sea la diferencia de carga (la diferencia de potencial o voltaje) entre los dos compartimientos, mayor será la diferencia en la energía libre. Por tanto, la tendencia de un electrólito a difundirse entre dos compartimientos depende de dos gradientes: un gradiente químico, determinado por la diferencia de concentración de la sustancia entre los dos compartimientos, y el gradiente de potencial eléctrico, determinado por la diferencia de carga. Juntas, estas diferencias se combinan para formar un **gradiente electroquímico**. El cambio de energía libre para la difusión de un electrólito en la célula es

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]} + zP\Delta E_m$$

donde $z$ es la carga eléctrica del soluto, $F$ la constante de Faraday (23.06 kcal/V · equivalente, donde un equivalente es la cantidad de electrólito que tiene un mol de carga eléctrica) y $\Delta E_m$ la diferencia de potencial (en volts) entre los dos compartimientos. Vimos en el ejemplo anterior que una diferencia de 10 veces en la concentración de un no electrólito a través de una membrana a 25 °C genera un $\Delta G$ de −1.4 kcal/mol. Supongamos que el gradiente de concentración consiste en iones de $Na^+$, que estaban presentes en una concentración 10 veces mayor fuera de la célula que en el citoplasma. Debido a que el voltaje típico a través de la membrana de una célula es de alrededor de −70 mV (página 159), el cambio de energía libre para el movimiento de 1 mol de iones de $Na^+$ en la célula bajo estas condiciones sería

$$\Delta G = -1.4 \text{ kcal/mol} + zF\Delta E_m$$

$$\Delta G = -1.4 \text{ kcal/mol} + (1)(23.06 \text{ kcal/V} \cdot \text{mol})(-0.07\text{V})$$

$$\Delta G = -3.1 \text{ kcal/mol}$$

Por tanto, bajo estas condiciones la diferencia de concentración y el potencial eléctrico hacen contribuciones similares al almacenamiento de energía libre a través de la membrana.

La interacción entre la concentración y las diferencias de potencial se observa en la difusión de iones de potasio ($K^+$) fuera de una célula. El eflujo del ion se ve favorecido por el gradiente de concentración de $K^+$, que tiene una mayor concentración de $K^+$ dentro de la célula, pero obstaculizada por el gradiente eléctrico que crea su difusión, lo que deja una carga negativa más alta dentro de la célula. Discutiremos más sobre este tema cuando consideremos el tema de los potenciales de membrana y los impulsos nerviosos en la sección 4.16.

**REPASO**

1. Compare y correlacione las cuatro formas básicamente diferentes en que una sustancia se puede mover a través de la membrana plasmática (como se indica en la figura 4-33).
2. Contraste la diferencia energética entre la difusión de un electrólito frente a un no electrólito a través de la membrana.

## 4.10 Difusión a través de la bicapa lipídica

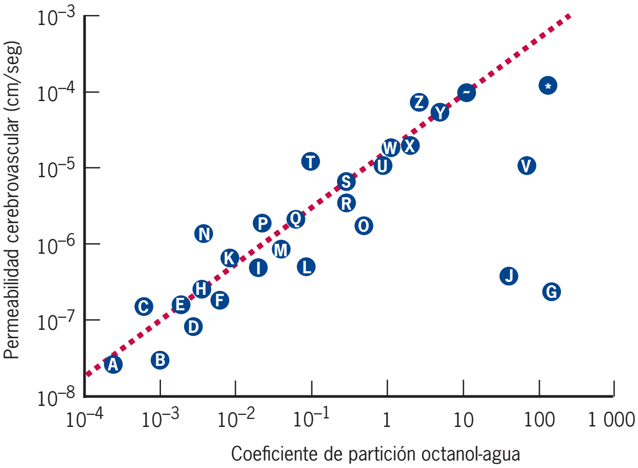
La membrana plasmática es una barrera permeable selectiva que permite el paso de soluto por varios mecanismos, incluida la difusión simple a través de la bicapa lipídica. La difusión es un proceso independiente de la energía en el que un soluto desciende un gradiente electroquímico, y disipa la energía libre almacenada en el gradiente. Los solutos inorgánicos pequeños como el $O_2$, $CO_2$ y $H_2O$ penetran fácilmente en la bicapa lipídica, al igual que los solutos con alta solubilidad en lípidos. Los iones y las soluciones orgánicas polares, como azúcares y aminoácidos, requieren transportadores especiales para entrar o salir de la célula.

### Difusión de sustancias a través de membranas

Se deben cumplir dos requisitos antes de que un no electrólito se pueda difundir pasivamente a través de una membrana plasmática. La sustancia debe estar presente a mayor concentración en un lado de la membrana que el otro, y la membrana debe ser permeable a la sustancia. Una membrana puede ser permeable a un soluto dado, ya sea 1) porque ese soluto puede pasar directamente a través de la bicapa lipídica, o 2) porque ese soluto puede atravesar un poro acuoso que abarca la membrana. Comencemos por considerar la ruta anterior, en la que una sustancia debe disolverse en la bicapa lipídica en su camino a través de la membrana.

La discusión de la difusión simple nos lleva a considerar la polaridad de un soluto. Una medida simple de la polaridad (o no polaridad) de una sustancia es su **coeficiente de partición**, que es la relación de su solubilidad en un disolvente no polar, como el octanol o un aceite vegetal, a la del agua, en condiciones en que el disolvente no polar y el agua están mezclados. La **FIGURA 4-34** muestra la relación entre el coeficiente de partición y la permeabilidad de la membrana de una variedad de sustancias químicas y fármacos. Se hace evidente que cuanto mayor es la solubilidad de los lípidos más rápida es la penetración.

Otro factor que determina la tasa de penetración de un compuesto a través de una membrana es su tamaño. Si dos moléculas




**A**. Sacarosa
**B.** Epipodofilotoxina
**C.** Manitol
**D.** Arabinosa
**E.** *N*-metil nicotinamida
**F.** Metotrexato
**G.** Vincristina
**H.** Urea
**I.** Formamida
**J.** Vinblastina
**K.** Curare
**L.** Tiourea
**M.** Dianhidrogalacticol
**N.** Glicerol
**O.** 5-FU
**P.** Etilenglicol
**Q.** Acetamida
**R.** Ftorafur
**S.** Misonidazol
**T.** Propilenglicol
**U.** Metronidazol
**V.** Mostaza de espirohidantoína
**W.** Procarbazina
**X.** PCNU
**Y.** Antipirina
**Z.** Cafeína
**~.** BCNU
***.** CCNU

**FIGURA 4-34 Relación entre el coeficiente de partición y la permeabilidad de la membrana.** En este caso se realizaron mediciones de la penetración de varias sustancias químicas y fármacos a través de las membranas plasmáticas de las células que recubren los capilares del cerebro. Las sustancias penetran estas células por un paso a través de la bicapa lipídica. El coeficiente de partición se expresa como la relación entre la solubilidad de un soluto en octanol y su solubilidad en agua. La permeabilidad se expresa como penetrancia (P) en cm/s. Para todos, excepto unos pocos compuestos como la vinblastina y vincristina, la penetrancia es directamente proporcional a la solubilidad de los lípidos.

FUENTE: De N. J. Abbott e I. A. Romero, *Molec Med Today* 1996;2:110; Copyright 1996, con permiso de Elsevier Science.

tienen coeficientes de partición aproximadamente equivalentes, la molécula más pequeña tiende a penetrar la bicapa lipídica de una membrana más rápido que la mayor. Las moléculas muy pequeñas y sin carga penetran muy rápido a través de las membranas celulares. En consecuencia, las membranas son altamente permeables a moléculas inorgánicas pequeñas, como el $O_2$, $CO_2$, NO y $H_2O$, que se cree se deslizan entre fosfolípidos adyacentes. Por el contrario, las moléculas polares más grandes, como azúcares, aminoácidos e intermedios fosforilados, exhiben una pobre capacidad de penetración de la membrana. Como resultado, la bicapa lipídica de la membrana plasmática proporciona una barrera efectiva que evita que estos metabolitos esenciales se difundan fuera de la célula. Algunas de estas moléculas (p. ej., azúcares y aminoácidos) deben ingresar a las células del torrente sanguíneo, pero no pueden hacerlo por simple difusión. En su lugar, deben existir mecanismos especiales para mediar en su penetración a través de la membrana plasmática. El uso de tales mecanismos permite que una célula regule el movimiento de sustancias a través de su barrera de superficie. Más adelante volveremos a esta característica de las membranas.

## Difusión del agua a través de las membranas

Las moléculas de agua se mueven mucho más rápido a través de una membrana celular que los iones disueltos o pequeños solutos orgánicos polares, que son esencialmente no penetrantes. Debido a esta diferencia en la capacidad de penetración del agua frente a los solutos se dice que las membranas son **semipermeables**. El agua se mueve fácilmente a través de una membrana semipermeable desde una región de menor concentración de *soluto* a una región de mayor concentración de *soluto*. Este proceso se llama **ósmosis**, y se demuestra de inmediato al colocar una célula en una solución que contenga un soluto no penetrante a una concentración diferente a la presente dentro de la célula.

Cuando dos compartimientos de diferente concentración de soluto están separados por una membrana semipermeable, se dice que el compartimiento con la concentración de soluto más alta es **hipertónico** (o **hiperosmótico**) en relación con el compartimiento de menor concentración de soluto, que se describe como **hipotónico** (o **hipoosmótico**). Cuando se coloca una célula en una solución hipotónica, la célula gana agua rápidamente por ósmosis y se expande (véase **FIGURA 4-35*a***). Por el contrario, una célula colocada en una solución hipertónica pierde agua rápidamente por ósmosis y se contrae (consúltese figura 4-35*b*). Estas simples observaciones muestran que el volumen de una

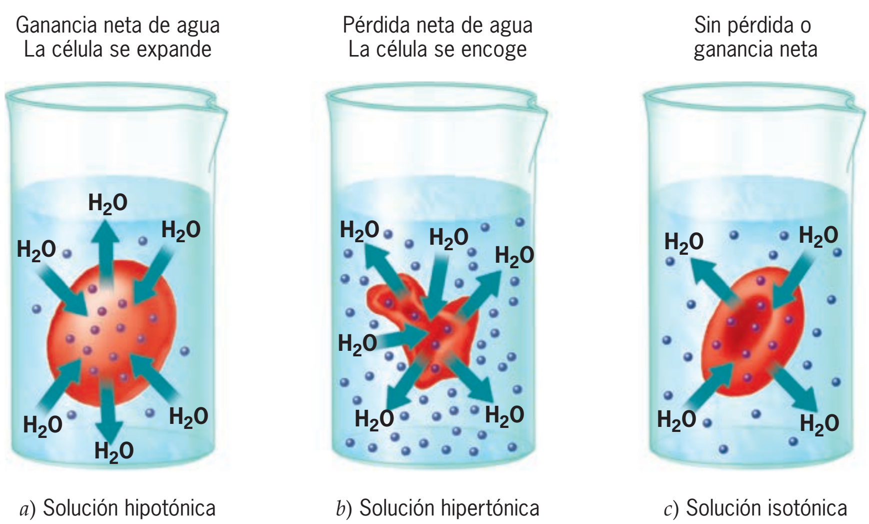



**FIGURA 4-35 Efectos de la diferencia en la concentración de solutos en lados opuestos de la membrana plasmática.** *a*) Una célula colocada en una solución hipotónica (una que tiene una concentración de soluto más baja que la célula) se expande debido a una ganancia neta de agua por ósmosis. *b*) Una célula en una solución hipertónica se contrae debido a una pérdida neta de agua por ósmosis. *c*) Una célula colocada en una solución isotónica mantiene un volumen constante, porque el flujo de agua hacia el interior es igual al flujo hacia afuera.

célula está controlado por la diferencia entre la concentración de soluto dentro de ella y la del medio extracelular. Por lo general, la expansión y contracción de las células en medios ligeramente hipotónicos e hipertónicos son solo eventos temporales. En unos minutos, las células se recuperan y vuelven a su volumen original. En un medio hipotónico la recuperación ocurre cuando las células pierden iones, lo que reduce su presión osmótica interna. En un medio hipertónico, la recuperación ocurre cuando las células obtienen iones del medio. Una vez que la concentración interna de soluto —que incluye una alta concentración de proteínas disueltas— es igual a la concentración externa de soluto, los fluidos internos y externos son **isotónicos** (o **isosmóticos**) y no se produce movimiento neto de agua hacia o desde las células (véase figura 4-35*c*).



La ósmosis es un factor importante en una multitud de funciones corporales. Nuestro tracto digestivo, por ejemplo, secreta varios litros de líquido diariamente, que las células que recubren el intestino reabsorben osmóticamente. Si este líquido no se reabsorbe, como ocurre en los casos de diarrea extrema, nos enfrentaríamos a la perspectiva de una deshidratación rápida. De hecho, la enfermedad bacteriana del cólera mata a más de 100 000 personas cada año, en lo esencial debido a la pérdida de agua en los intestinos, impulsada por la ósmosis. Las plantas utilizan la ósmosis de diferentes maneras. A diferencia de las células animales, que por lo general son isotónicas con el medio en el que se sumergen, las células vegetales usualmente son hipertónicas en comparación con su entorno fluido. Como resultado hay una tendencia a que el agua ingrese a la célula, lo que provoca que desarrolle una presión interna (*turgencia*) que la empuja contra la pared circundante (obsérvese la **FIGURA 4-36*a***). La presión de turgencia proporciona soporte para plantas no leñosas y para las partes no leñosas de los árboles, como las hojas. Si una célula vegetal se coloca en un medio hipertónico, su volumen se reduce a medida que la membrana plasmática se aleja de la pared celular circundante, un proceso llamado **plasmólisis** (véase la figura 4-36*b*). La pérdida de agua debido a la plasmólisis hace que las plantas pierdan su soporte y se marchiten.

No todas las células son igualmente permeables al agua. De hecho, muchas células son mucho más permeables al agua de lo que se puede explicar por simple difusión a través de la bicapa lipídica. Una familia de pequeñas proteínas integrales, llamadas acuaporinas, permite el movimiento pasivo de agua de un lado de la membrana plasmática al otro. Cada subunidad de acuaporina (en la proteína de cuatro subunidades) contiene un canal central, que está alineado principalmente con residuos de aminoácidos hidrofóbicos y es altamente específico para las moléculas de agua. Alrededor de mil millones o tanto de moléculas de agua pueden pasar por segundo —en solo una línea— a través de cada canal. Al mismo tiempo los iones $H^+$, que normalmente saltan a lo largo de una cadena de moléculas de agua, no pueden penetrar estos poros abiertos. Una combinación de estudios cristalográficos de rayos X ha sugerido el aparente mecanismo por el cual estos canales son capaces de excluir protones, ha revelado la estructura de la proteína, y simulaciones de dinámica molecular (página 58) que han puesto esta estructura proteica en operación. Un modelo con base en tales simulaciones se muestra en la **FIGURA 4-37*a*)**. Muy cerca de su punto más estrecho, la pared de un canal de acuaporina contiene un par de cargas eléctricas positivas posicionadas con precisión (residuos N203 y N68 en la figura 4-37*b*) que atraen el átomo de oxígeno de cada molécula de agua a medida que avanza a través de la constricción de la proteína. Esta interacción reorienta la molécula de agua central en una posición que le impide mantener los enlaces de hidrógeno que normalmente la unen a las vecinas moléculas de agua. Esto elimina el puente que normalmente permitiría que los protones se muevan de una molécula de agua a otra.

Las acuaporinas son particularmente prominentes en células como las de un túbulo renal o la raíz de una planta, donde el paso del agua desempeña un papel crucial en las actividades fisiológicas del tejido. La hormona vasopresina, que estimula la retención de agua por los conductos colectores del riñón, actúa por medio de una de estas proteínas (AQP2). Algunos casos del trastorno hereditario *diabetes insípida nefrogénica congénita* se originan a partir de mutaciones en este canal de acuaporina. Las personas que padecen esta enfermedad excretan grandes cantidades de orina, porque sus riñones no responden a la vasopresina.

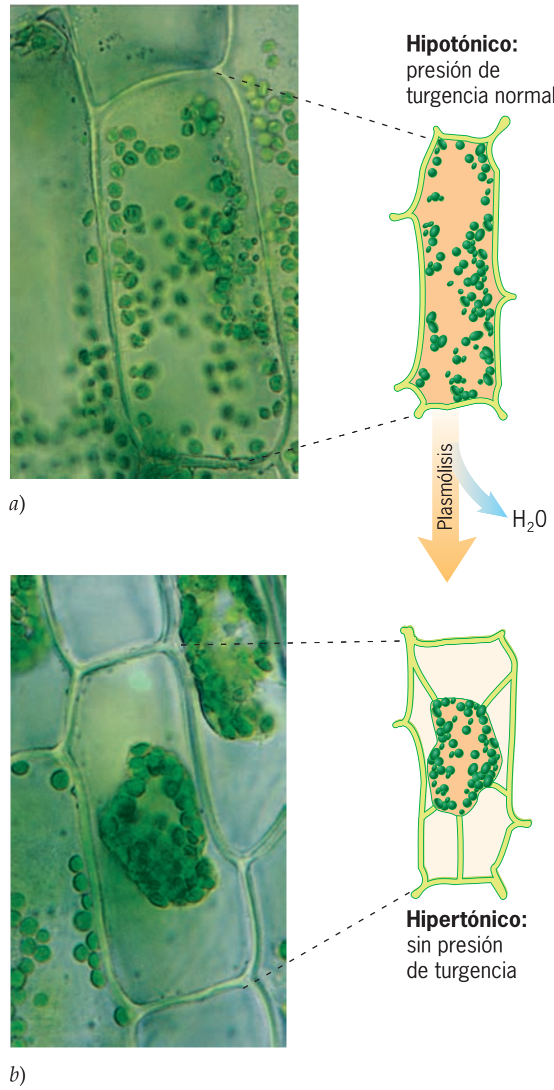
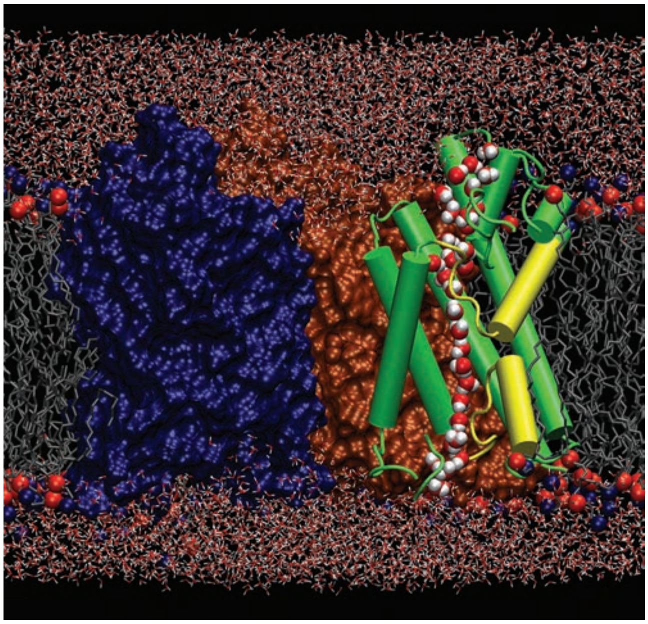



**FIGURA 4-36 Efectos de la ósmosis en una célula vegetal.** *a*) Las plantas acuáticas que viven en agua dulce están rodeadas por un entorno hipotónico. Por tanto, el agua tiende a fluir hacia las células, creando presión de turgencia. *b*) Si la planta se coloca en una solución hipertónica como el agua de mar, la célula pierde agua y la membrana plasmática se separa de la pared celular.

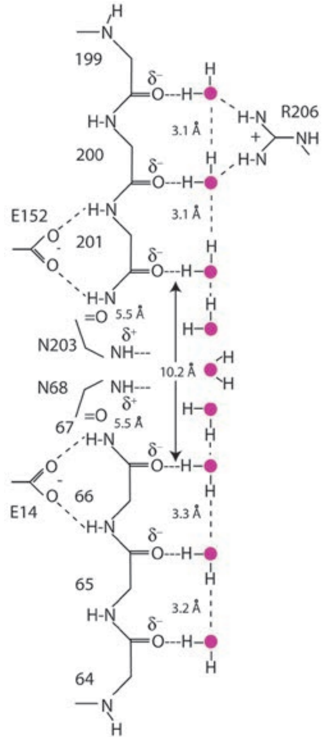
FUENTE: Ed Reschke.

## REPASO

1. Describa la relación entre el coeficiente de partición y el tamaño molecular con respecto a la permeabilidad de la membrana.
2. Explique los efectos de poner una célula en un medio hipotónico, hipertónico o isotónico.



a)




b)

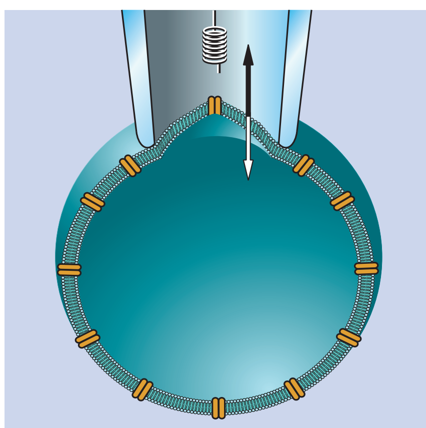
**FIGURA 4-37 El paso de moléculas de agua a través de un canal de acuaporina.** *a*) Instantánea de una simulación de dinámica molecular de una corriente de moléculas de agua (esferas rojas y blancas) que pasan en una sola fila a través del canal de una de las subunidades de una molécula de acuaporina, que reside dentro de una membrana. *b*) Modelo que describe el mecanismo por el cual las moléculas de agua pasan a través de un canal de acuaporina con la exclusión simultánea de protones. Se muestra que nueve moléculas de agua están alineadas en una sola fila a lo largo de la pared del canal. Cada molécula de agua se representa como un átomo O circular rojo con dos H asociados. En este modelo las cuatro moléculas de agua en la parte superior e inferior del canal están orientadas, como resultado de su interacción con los grupos carbonilo (C═O) de la cadena principal de la proteína (página 49), con sus átomos de H apuntando lejos del centro del canal. Estas moléculas de agua pueden formar enlaces de hidrógeno (líneas discontinuas) con sus vecinos. Por el contrario, la única molécula de agua en el centro del canal está orientada en una posición que evita que forme enlaces de hidrógeno con otras moléculas de agua, lo que tiene el efecto de interrumpir el flujo de protones a través del canal. Las animaciones de los canales de acuaporina se pueden encontrar en www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/animations.html

FUENTE: *a*) De Benoit Roux y Klaus Schulten. *Structure* 2004;12:1344, con permiso de Elsevier; *b*) De R. M. Stroud *et al*. *Curr Opin Struct Biol* 13:428, © 2003, con permiso de Elsevier.

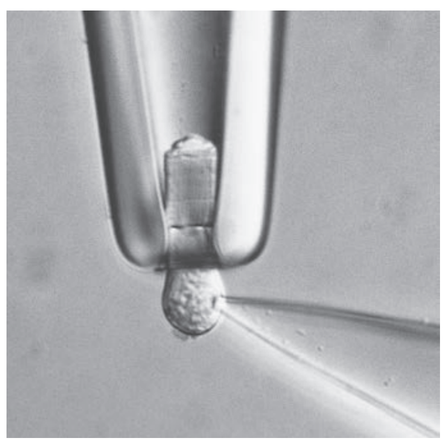
## 4.11 La difusión de iones a través de membranas

La bicapa lipídica que constituye el núcleo de las membranas biológicas es altamente impermeable a las sustancias cargadas, incluidos los iones pequeños como $Na^+$, $K^+$, $Ca2^+$ y $Cl^-$. Sin embargo, el movimiento rápido (**conductancia**) de estos iones a través de las membranas realiza un papel crítico en muchas actividades celulares, que comprenden la formación y propagación de un impulso nervioso, secreción de sustancias en el espacio extracelular, contracción muscular, regulación del volumen celular, y la apertura de los poros estomáticos en las hojas de las plantas.

En 1955, Alan Hodgkin y Richard Keynes de la Universidad de Cambridge propusieron por primera vez que las membranas celulares contienen canales iónicos; es decir, aberturas en la membrana que son permeables a iones específicos. La prueba directa de la existencia de canales iónicos surgió a través del trabajo de Bert Sakmann y Erwin Neher en el Instituto Max-Planck en Alemania, a fines de la década de 1970 y principios de la década de 1980, quienes desarrollaron técnicas para monitorear la corriente iónica que pasa a través de un único canal de iones. Esto se logra con microelectrodos en una pipeta muy fina, hechos de vidrio pulido, que se colocan en la superficie externa de la célula y se sellan a la membrana mediante succión. El voltaje a través de la membrana se puede mantener (*ajustar*) a cualquier valor particular, y se puede medir la corriente originada en el pequeño parche de membrana rodeado por la pipeta (véase **FIGURA 4-38**). Estos estudios históricos marcaron las primeras investigaciones exitosas sobre las actividades de las moléculas de proteínas individuales. En la actualidad los biólogos han identificado una variedad desconcertan-



a)



b)

35 μm

**FIGURA 4-38 Medición de la conductancia del canal iónico mediante registro con pinza y parche. Técnica de fijación de membrana (patch-clamp).** *a*) En esta técnica se coloca una micropipeta de vidrio altamente pulida contra una parte de la superficie externa de una célula y se aplica succión para sellar el borde de la pipeta contra la membrana plasmática. Como la pipeta está cableada como un electrodo (un microelectrodo) es posible aplicar un voltaje a través del parche de membrana encerrado por la pipeta, y medir el flujo de respuesta de los iones a través de los canales de la membrana. Como se indica en la figura, la micropipeta puede encerrar un parche de membrana que contiene un solo canal de iones, lo que permite a los investigadores controlar la apertura y el cierre de un único canal con compuerta, así como su conductancia a diferentes voltajes aplicados. *b*) La micrografía muestra registros con pinza y parche realizadas a partir de una única célula fotorreceptora de la retina de una salamandra. Una parte de la célula se aspira en una micropipeta de vidrio por succión, mientras que una segunda micropipeta-electrodo (abajo a la derecha) se sella contra un pequeño parche de la membrana plasmática en otra porción de la célula.

FUENTE: *b*) De T. D. Lamb, H. R. Matthews, V. Torre. *J. Physiology* 1986;372:319. © 1986, reproducida con permiso de John Wiley & Sons.

te de canales iónicos, cada uno formado por proteínas integrales de membrana que encierran un poro acuoso central. Como era de esperar, las mutaciones en los genes que codifican los canales iónicos pueden conducir a muchas enfermedades graves (consúltese tabla 1 de "La perspectiva humana", página 158).



La mayoría de los canales de iones son altamente selectivos, al permitir que solo un tipo particular de iones pase a través del poro. Como ocurre con la fusión pasiva de otros tipos de solutos a través de las membranas, la difusión de iones a través de un canal siempre es descendente; es decir, desde un estado de energía superior a un estado de energía inferior. La mayoría de los canales iónicos que se han identificado pueden existir en una configuración abierta o cerrada; se dice que dichos canales son de **compuerta**. La apertura y el cierre de las compuertas están sujetos a una regulación fisiológica compleja y se pueden inducir por una variedad de factores, en dependencia del canal particular. Se distinguen tres categorías principales de canales con compuerta:

1. **Canales activados por voltaje**, cuyo estado conformacional depende de la diferencia en la carga iónica en ambos lados de la membrana.
2. **Canales activados por ligandos**, cuyo estado conformacional depende del enlace de una molécula específica (el ligando), que normalmente no es el soluto que pasa a través del canal. Algunos canales activados por ligandos se abren (o se cierran) después de la unión de una molécula a la superficie externa del canal; otros se abren (o se cierran) después de la unión de un ligando a la superficie interna del canal. Por ejemplo, los neurotransmisores, como la acetilcolina, actúan sobre la superficie externa de ciertos canales de cationes, mientras que los nucleótidos cíclicos, como el cAMP, actúan sobre la superficie interna de ciertos canales de iones de calcio.
3. **Canales de compuerta mecánica** cuyo estado conformacional depende de las fuerzas mecánicas (p. ej., tensión de estiramiento) que se aplican a la membrana. Por ejemplo, los miembros de una familia de canales de cationes se abren mediante los movimientos de los estereocilios (véase figura 9-46) en las células ciliadas del oído interno, en respuesta al sonido o los movimientos de la cabeza.

En la siguiente discusión nos centraremos en la estructura y función de los canales de iones de potasio que dependen del voltaje, porque estos son los mejores comprendidos.

En 1998 Roderick MacKinnon y sus colegas de la Universidad Rockefeller proporcionaron la primera imagen de resolución atómica de una proteína de canal iónico; en este caso, un canal de ion $K^+$ bacteriano llamado KcsA. La relación entre estructura y función es evidente dondequiera en el mundo biológico, pero sería difícil encontrar un mejor ejemplo que el canal de iones $K^+$ representado en la **FIGURA 4-39**. Como se verá en breve, la formulación de esta estructura condujo directamente a la comprensión del mecanismo por el cual estas notables máquinas moleculares pueden seleccionar abrumadoramente los iones $K^+$ sobre los iones $Na^+$, pero al mismo tiempo permiten una conductancia increíblemente rápida de iones $K^+$ a través de la membrana. También se verá que los mecanismos de selectividad iónica y conductancia en este canal bacteriano son prácticamente idénticos a los que operan en los canales de mamíferos mucho mayores. Resulta evidente que los desafíos básicos en el funcionamiento de un canal iónico se resolvieron relativamente temprano en la evolución, aunque muchos refinamientos aparecieron en los siguientes uno o dos mil millones de años.

El canal KcsA consta de cuatro subunidades, dos de las cuales se muestran en la figura 4-39. Se considera que cada subunidad de la figura 4-39 contiene dos hélices que abarcan la membrana (M1 y M2) y una región de poro (P) en el extremo extracelular del canal. La P consiste en una hélice de poro corto que se extiende aproximadamente un tercio del ancho del canal, y un bucle no helicoidal (color marrón claro en la figura 4-39) que forma el revestimiento de un *filtro de selectividad* estrecho, llamado así por su función de permitir solo el paso de iones $K^+$.

El revestimiento del filtro de selectividad contiene un pentapéptido —Gly-Tyr-Gly-Val-Thr altamente conservado— (o GYGVT en la nomenclatura de una sola letra). La estructura cristalina de rayos X del canal KcsA muestra que los grupos carbonilo de la columna (C=O) del pentapéptido conservado (véase la estructura de la columna en la página 49) crean cinco anillos sucesivos de átomos de oxígeno (cuatro anillos están formados por oxígenos de carbonilo de la estructura polipeptídica, y un anillo consta de átomos de oxígeno de la cadena lateral de treonina). Cada anillo contiene cuatro átomos de oxígeno (uno de cada subunidad) y tiene un diámetro de aproximadamente 3 Å, que es ligeramente mayor que el diámetro de 2.7 Å de un ion $K^+$ que ha perdido su caparazón de hidratación normal. En consecuencia, los átomos

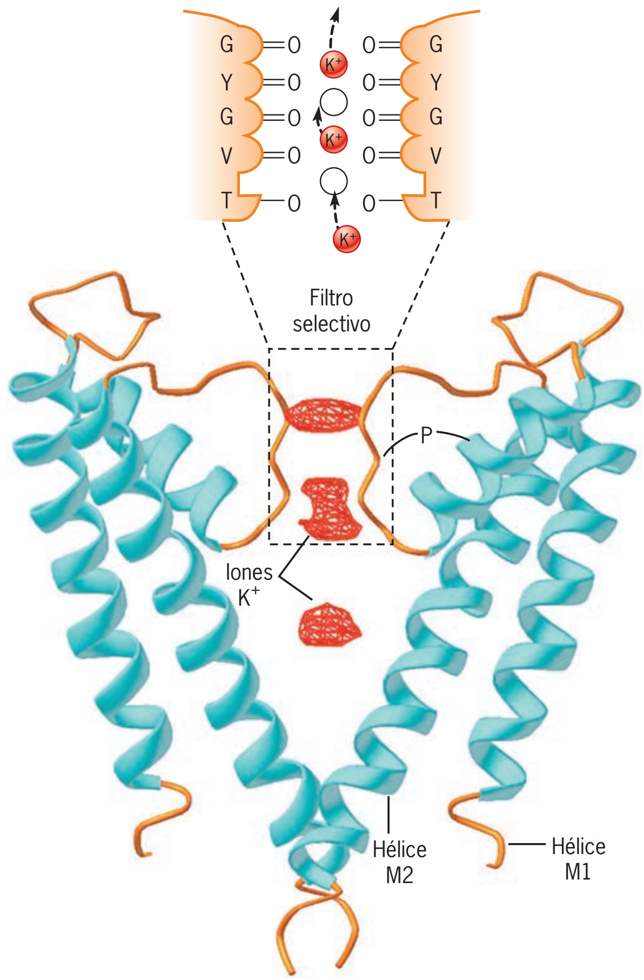



**FIGURA 4-39 Estructura tridimensional del canal bacteriano KcsA y la selección de iones $K^+$.** Este canal de iones $K^+$ consta de cuatro subunidades, dos de las cuales se muestran aquí. Cada subunidad está compuesta de hélices M1 y M2 unidas por un segmento P (poro) que consiste en una hélice corta y una porción no helicoidal, que recubre el canal a través del cual pasan los iones. Una porción de cada segmento P contiene un pentapéptido conservado (GYGVT) cuyos residuos recubren el filtro de selectividad que filtra los iones $K^+$. Los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de estos residuos se proyectan en el canal donde pueden interactuar selectivamente con los iones $K^+$ (indicados por los objetos de malla roja) dentro del filtro. Como se indica en el recuadro superior, el filtro de selectividad contiene cuatro anillos de átomos de carbonilo O y un anillo de átomos de treonilo O; cada uno de estos cinco anillos contiene cuatro átomos de O, uno donado por cada subunidad. El diámetro de los anillos es bastante grande para que ocho átomos de O puedan coordinar un único ion $K^+$, reemplazando su agua de hidratación normal. Aunque se muestran cuatro sitios de unión $K^+$, solo dos están ocupados a la vez.

FUENTE: De Roderick MacKinnon, *Nature Med* 5:1108, © 1999, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

de O electronegativos que recubren el filtro de selectividad pueden sustituir la cubierta de las moléculas de agua, que se desplazan a medida que cada ion $K^+$ ingresa al poro. En este modelo el filtro de selectividad contiene cuatro posibles sitios de unión de iones $K^+$. Como se indica en el recuadro superior de la figura 4-39, un ion $K^+$ unido a cualquiera de estos cuatro sitios ocuparía el centro de una "caja" que tiene cuatro átomos de O en un plano por encima del ion, y cuatro átomos de O en un plano por debajo del átomo. Como resultado, cada ion $K^+$ en uno de estos sitios se podría coordinar con ocho átomos de O del filtro de selectividad. Mientras que el filtro de selectividad es un ajuste preciso para un ion $K^+$ deshidratado, es mucho más grande que el diámetro de un ion $Na^+$ deshidratado (1.9 Å). En consecuencia, un ion $Na^+$ no puede interactuar de manera óptima con los ocho átomos de oxígeno necesarios para estabilizarlo en el poro. Como resultado, los iones $Na^+$ más pequeños no pueden superar la barrera de energía más alta requerida para penetrar en el poro.

Aunque hay cuatro sitios potenciales de unión de iones $K^+$, solo dos están ocupados en un momento dado. Se cree que los iones de potasio se mueven de dos en dos, desde los sitios 1 y 3 hasta los sitios 2 y 4, como se indica en el recuadro superior de la figura 4-39. La entrada de un tercer ion $K^+$ en el filtro de selectividad crea una repulsión electrostática, que expulsa el ion unido en el extremo opuesto de la línea. Los estudios indican que prácticamente no hay barrera de energía para que un ion se mueva de un sitio de unión al siguiente, lo que explica el flujo extremadamente rápido de iones a través de la membrana. En conjunto, estas conclusiones sobre la selectividad y la conductancia del ion $K^+$ proporcionan un excelente ejemplo de cuánto se puede aprender sobre la función biológica a través de la comprensión de la estructura molecular.

El canal KcsA representado en la figura 4-39 tiene una compuerta igual a la de los canales eucarióticos. La apertura de la compuerta del canal KcsA en respuesta a un pH muy bajo se ilustra en la figura 4-22. La estructura del KcsA que se muestra en la figura 4-39 es en realidad la conformación cerrada de la proteína (a pesar de que contiene iones en su canal). La comparación de las estructuras abierta y cerrada del KcsA sugiere fuertemente que la activación de estas moléculas se lleva a cabo mediante cambios conformacionales de los extremos citoplasmáticos de las hélices internas (M2). En la conformación cerrada, como se ve en la figura 4-39 y en la **FIGURA 4-40** en azul, las hélices M2 son rectas y se cruzan entre sí para formar un " haz helicoidal" que sella la cara citoplásmica del poro. En el modelo que se muestra en la figura 4-40, el canal se abre cuando las hélices M2 se doblan en un punto específico de bisagra, donde está localizado un residuo de glicina.

Ahora que hemos visto cómo operan estos canales procarióticos de $K^+$, estamos en una mejor posición para entender la estructura y la función de las versiones eucarióticas más complejas, que se cree que tienen formas similares. Se han aislado genes que codifican una variedad de canales de $K^+$ (o Kv) dependientes de la edad, y se investigó la anatomía molecular de sus proteínas. Los canales Kv de las plantas desempeñan un papel importante en el equilibrio de la sal y el agua, y en la regulación del volumen celular. Los canales Kv de animales son mejor conocidos por su papel en la función muscular y nerviosa, que se explora al final del capítulo. Las subunidades de los canales de Kv eucariotas contienen seis hélices asociadas a la membrana llamadas S1-S6, que se muestran en dos dimensiones en la figura 4-41. Estas seis hélices se pueden agrupar en dos dominios funcionales distintos:

1. Un **dominio poro**, que tiene la misma arquitectura básica que la del canal bacteriano completo ilustrado en la figura 4-39, y contiene un filtro de selectividad que permite el paso selectivo de iones $K^+$. Las hélices M1 y M2 y el segmento P del canal KcsA de la figura 4-39 son homólogos de las hélices S5 y S6 y del segmento P del canal eucariótico activado por voltaje, ilustrado en la **FIGURA 4-41**. Al igual que las cuatro hélices M2 de KcsA, las cuatro hélices S6 recubren gran parte del poro, y su configuración determina si la compuerta del canal está abierta o cerrada.
2. Un **dominio sensor de voltaje** que consiste en hélices S1-S4 que detectan el voltaje a través de la membrana plasmática (como se explica más adelante).

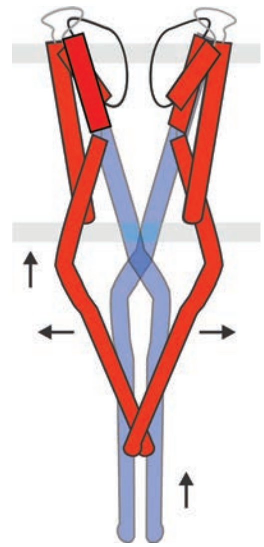


**FIGURA 4-40 Ilustración esquemática del modelo de flexión en bisagra para la apertura del canal KcsA.** Las hélices M2 de cada subunidad se curvan hacia afuera en un residuo de glicina específico, que abre la compuerta en el extremo intracelular del canal a los iones $K^+$.

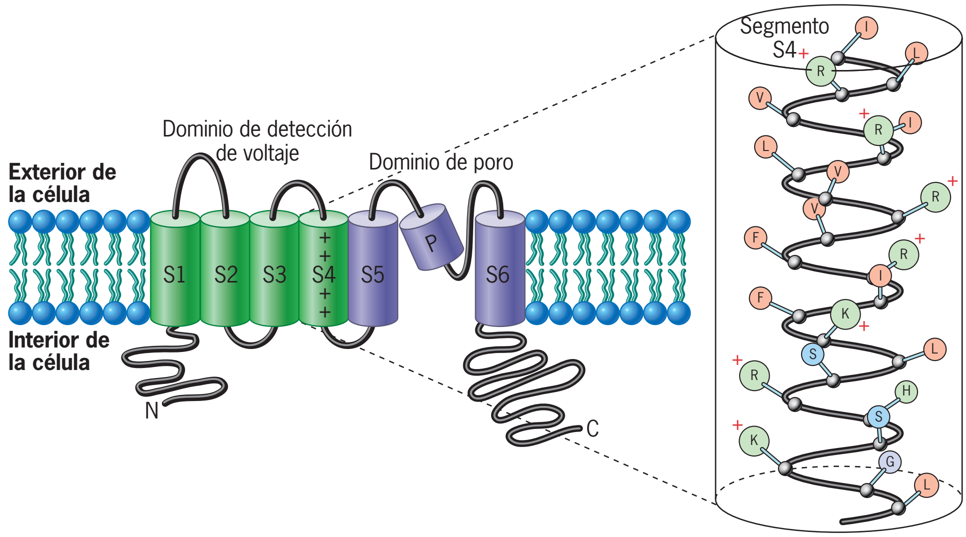
FUENTE: Serdar Uysal, *et al*. Mechanism of activation gating in the full-ength KcsA K+ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:11896-9.

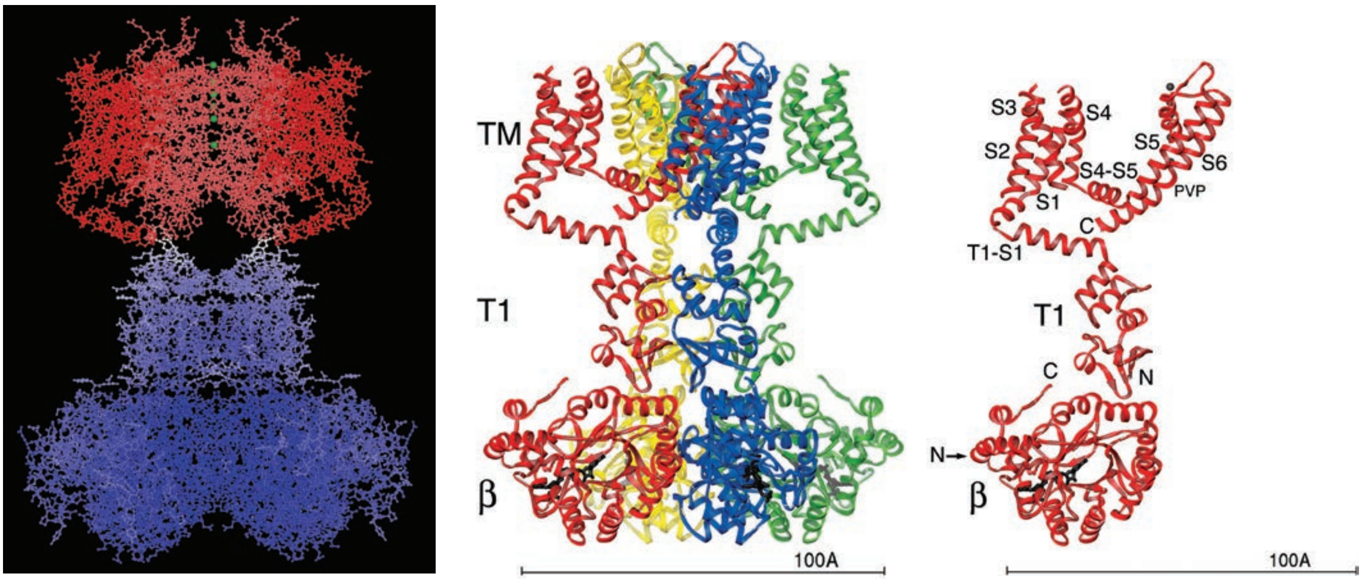
La estructura cristalina tridimensional de un canal de Kv eucariótico completo purificado a partir de cerebro de rata se muestra en la **FIGURA 4-42*a***). La determinación de esta estructura se hizo posible mediante el uso de una mezcla de detergente y lípido durante todo el proceso de purificación y cristalización. Se cree que es importante la presencia de fosfolípidos cargados negativamente para mantener la estructura nativa de la proteína de membrana, y promover su función como un canal controlado por voltaje. Al igual que el canal KcsA, un único canal Kv eucariótico consta de cuatro subunidades homólogas dispuestas simétricamente alrededor del poro central conductor de iones (véase figura 4-42*b*). El filtro de selectividad, y por tanto el mecanismo que se presume para la selección de iones $K^+$, es virtualmente idéntico en las proteínas KcsA procarióticas y Kv eucarióticas. La compuerta que conduce a un canal Kv está formada por los extremos internos de las hélices S6, y se piensa que se abre y se cierra de una manera aproximadamente similar a la de las hélices M2 del canal bacteriano (que se muestra en la figura 4-40). La proteína representada en la figura 4-42 muestra el estado abierto del canal.[6]

La hélice S4, que contiene varios residuos de aminoácidos cargados positivamente espaciados a lo largo de la cadena polipeptídica (recuadro de la figura 4-41), actúa como el elemento clave del detector de voltaje. Se ve que el dominio de detección de voltaje está conectado al dominio poro mediante una hélice corta enlazadora, designada como S4-S5 en el modelo de la figura 4-42*b*). En condiciones de reposo, el potencial negativo a través de la membrana (página 159) mantiene la compuerta cerrada. Un cambio en el potencial a un valor más positivo (una despolarización, página 160) ejerce una fuerza eléctrica sobre la hélice S4. Se

[6] Otros estudios sugieren fuertemente que los canales de $K^+$ son controlados por dos mecanismos distintos: uno que involucra la apertura y el cierre del paquete de hélice interna como se describe aquí, y otro que involucra el filtro de selectividad que no se discute (véase *PNAS* 2010;107:7623, y *Nature* 2010;466:203).

**FIGURA 4-41. Estructura de una subunidad de un canal K⁺ eucariótico, activado por voltaje.** Un retrato bidimensional de una subunidad de canal de $K^+$ que muestra sus seis hélices transmembrana y una porción del polipéptido (llamada hélice de poro o P) que se sumerge en la proteína para formar parte de la pared del canal. El recuadro muestra la secuencia de aminoácidos de la hélice S4 con carga positiva del canal de iones *Drosophila K⁺ Shaker*, que sirve como un detector de voltaje. Las cadenas laterales cargadas positivamente están situadas en cada tercer residuo a lo largo de la hélice hidrofóbica. Este miembro de la familia Kv se llama canal *Shaker* porque las moscas con ciertas mutaciones en la proteína se agitan vigorosamente cuando se anestesian con éter. El canal *Shaker* fue el primer canal $K^+$ identificado y clonado en 1987.




*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 4-42 Estructura tridmensional del canal $K^+$ de mamíferos activado por voltaje**. *a*) Estructura cristalizada de todo el conducto tetramérico Kv1.2, un miembro de la familia *Shaker* de canales iónicos para $K^+$, que se encuentra en las células nerviosas del cerebro. La porción transmembrana aparece en rojo y la citoplásmica en azul. Los sitios para unión con el ion potasio se indican en verde. *b*) Modelo de listón del mismo canal mostrado en *a*), aparecen las cuatro subunidades que conforman el canal en colores diferentes. Si se centra la atención en la subunidad en rojo, se verá 1) la separación espacial entre el dominio sensor de voltaje y el dominio poro de la subunidad y 2) la manera en la cual el dominio sensor de voltaje de cada se encuentra en el margen externo del dominio poro de la subunidad vecina. La porción citoplásmica de este canal particular consiste en el dominio T1, el cual es parte del canal polipeptídico mismo y un polipéptido β aparte. *c*) Modelo tipo listón de una subunidad individual que muestra la orientación espacial de seis hélices que cruzan la membrana (S1-S6), así como la presencia de las hélices de unión S4-S5, que conecta los dominios sensor de voltaje y de poro. Estas hélices de unión transmiten la señal del sensor de voltaje S4 que abre el canal. La superficie interna del canal por debajo del dominio poro está cubierta por la hélice S6 (más o menos similar a la hélice M2 del canal bacteriano que aparece en la figura 4-39). El canal que se muestra aquí se presenta en la configuración abierta con su hélice S6 curvada hacia fuera (compárese con figura 4-40) en el sitio marcado PVP (que significa Pro-Val-Pro, la secuencia probable de aminoácidos de la "bisagra").

FUENTE: *a*-*c*) De Stephen B Long, *et al*. *Science* 2005;309:867, 899, cortesía de Roderick Mackinnon; © 2005, reimpreso con permiso de AAAS.

cree que esta fuerza hace que la hélice S4 transmembrana se mueva de manera tal que sus residuos, cargados positivamente, cambien de una posición en la que estuvieron expuestos al citoplasma a una nueva posición donde están expuestos al exterior de la célula. La detección de voltaje es un proceso dinámico cuyo mecanismo no se puede resolver con una única vista estática de la proteína, como la que se muestra en la figura 4-42. De hecho, actualmente se debaten varios modelos en competencia, que describen el mecanismo de acción del detector de voltaje. No obstante, ocurre que el movimiento de la hélice S4 en respuesta a la despolarización de la membrana inicia una serie de cambios conformacionales dentro de la proteína, que abre la compuerta en el extremo citoplásmico del canal.

Una vez abierto el canal, más de 10 millones de iones de potasio pueden pasar por segundo, que es casi la velocidad que alcanzaría la difusión libre en la solución. Debido al gran flujo de iones, la apertura de un número relativamente pequeño de canales de $K^+$ tiene un impacto significativo en las propiedades eléctricas de la membrana. Después que el canal está abierto durante unos pocos milisegundos, el movimiento de iones $K^+$ se detiene "automáticamente" mediante un proceso conocido como inactivación. Para comprender la inactivación del canal tenemos que

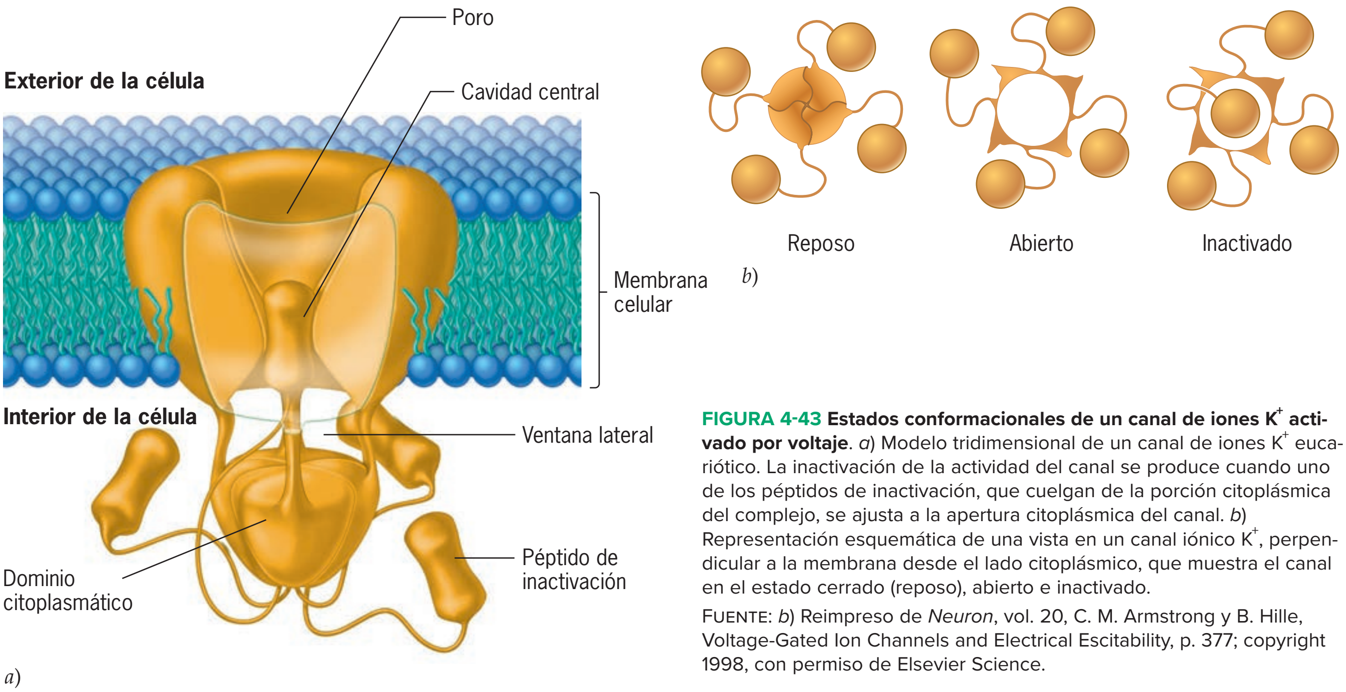



**FIGURA 4-43 Estados conformacionales de un canal de iones $K^+$ activado por voltaje**. *a*) Modelo tridimensional de un canal de iones $K^+$ eucariótico. La inactivación de la actividad del canal se produce cuando uno de los péptidos de inactivación, que cuelgan de la porción citoplásmica del complejo, se ajusta a la apertura citoplásmica del canal. *b*) Representación esquemática de una vista en un canal iónico $K^+$, perpendicular a la membrana desde el lado citoplásmico, que muestra el canal en el estado cerrado (reposo), abierto e inactivado.

FUENTE: *b*) Reimpreso de *Neuron*, vol. 20, C. M. Armstrong y B. Hille, Voltage-Gated Ion Channels and Electrical Escitability, p. 377; copyright 1998, con permiso de Elsevier Science.

considerar una porción adicional de un canal Kv, además de los dos dominios transmembrana discutidos anteriormente.

Es típico que los canales Kv eucarióticos contengan una gran estructura citoplásmica, cuya composición varía entre los diferentes canales. Como se indica en la **FIGURA 4-43*a***), la inactivación del canal se logra mediante el movimiento de un péptido de inactivación pequeño, que cuelga de la porción citoplásmica de la proteína. Se cree que el péptido de inactivación tiene acceso a la boca citoplásmica del poro, al serpentear a través de una de las cuatro "ventanas laterales" indicadas en la figura. Cuando uno de estos péptidos oscilantes se mueve hacia la boca del poro (obsérvese figura 4-43*a*), el paso de los iones se bloquea y el canal se inactiva. En una etapa posterior del ciclo se libera el péptido de inactivación y se cierra la compuerta del canal. De esta discusión se deduce que el canal de potasio puede existir en tres estados diferentes, abierto, inactivado y cerrado, lo que se ilustra en el esquema de la figura 4-43*b*).

Los canales de potasio vienen en muchas variedades. Es notable que el *C. elegans*, un gusano nematodo cuyo cuerpo consta de solo 1 000 células, contiene aproximadamente 80 genes diferentes que codifican canales de $K^+$. Es evidente que una sola célula, ya sea en un nematodo, humano o planta, tiene probabilidad de poseer una variedad de canales de $K^+$ diferentes que se abren y cierran en respuesta a diferentes voltajes. Además, el voltaje requerido para abrir o cerrar un canal de $K^+$ particular puede variar en dependencia de si la proteína del canal está fosforilada, que a su vez está regulada por hormonas y otros factores. Es evidente que la función del canal iónico está bajo el control de un conjunto diverso y complejo de agentes reguladores. La estructura y función de un tipo muy diferente de canal de iones, el receptor de acetilcolina nicotínico dependiente de ligando, es el tema de la sección de "Vías experimentales".

## REPASO

1. ¿Cuáles son los tres tipos diferentes de canales de compuerta?
2. Describa cómo un canal de potasio puede permitir el flujo de iones de potasio, pero evitar que fluyan los iones de sodio.

# 4.12 VÍAS EXPERIMENTALES

## El receptor acetilcolina

El descubrimiento del receptor acetilcolina ilustra el importante papel que las toxinas naturales, y organismos inusuales, pueden desempeñar en la disección de un proceso bioquímico fundamental, con una importancia central para la salud y la medicina. La historia comienza en 1843, cuando el farmacéutico y aspirante a dramaturgo Claude Bernard se mudó de una pequeña ciudad francesa a París, donde planeaba seguir su carrera literaria. En cambio, Bernard se inscribió en la escuela de medicina y se convirtió en el fisiólogo más destacado del siglo XIX. Entre sus muchos intereses estaba el mecanismo por el cual los nervios estimulan la contracción de los músculos esqueléticos. Sus estudios incluyeron el uso de curare, un fármaco altamente tóxico aislado de plantas tropicales, y usado durante siglos por cazadores nativos sudamericanos para hacer dardos venenosos. Bernard descubrió que el curare paralizaba el músculo esquelético sin interferir con la capacidad de los nervios para transmitir impulsos a ese músculo, o la capacidad del músculo para contraerse con la estimulación directa. Bernard concluyó que el curare de alguna manera actuaba en la región de contacto entre el nervio y el músculo.

Esta conclusión fue confirmada y extendida por John Langley, un fisiólogo de la Universidad de Cambridge. Langley estaba estudiando la capacidad de la nicotina, otra sustancia derivada de las plantas, para estimular la contracción de los múscu-

(*continúa*)

los esqueléticos de las ranas aisladas, y el efecto del curare en la inhibición de la acción de la nicotina. En 1906, Langley concluyó que "el impulso nervioso no debe pasar de un nervio a otro por una descarga eléctrica, sino por la secreción de una sustancia especial en el extremo del nervio".[1] Langley propuso que este "transmisor químico" era vinculante para una "sustancia receptiva" en la superficie de las células musculares, el mismo sitio que une a la nicotina y al curare. Estas demostraron ser propuestas con visión de futuro.

La propuesta de Langley de que el estímulo del nervio al músculo era transmitido por una sustancia química se confirmó en 1921, en un ingenioso experimento del fisiólogo nacido en Austria Otto Loewi, cuyo diseño le llegó a Loewi durante un sueño. La frecuencia cardiaca de un vertebrado está regulada por la entrada de dos nervios opuestos (antagonistas). Loewi aisló el corazón de una rana con ambos nervios intactos. Cuando estimuló el nervio inhibidor (vago), se liberó un químico de la preparación de corazón en una solución salina, que se dejó drenar en el medio que bañaba un segundo corazón aislado. La frecuencia del segundo corazón se redujo drásticamente, como si su propio nervio inhibitorio se hubiera activado.[2] Loewi llamó a la sustancia responsable de inhibir el corazón de la rana "Vagusstoff". En unos pocos años, Loewi había demostrado que las propiedades químicas y fisiológicas del Vagusstoff eran idénticos a la acetilcolina, y llegó a la conclusión de que la acetilcolina (ACh, *acetylcholine*) era la sustancia liberada por las puntas de las células nerviosas que formaban el nervio vago.

En 1937 David Nachmansohn, un neurofisiólogo de la Sorbona, visitaba la Feria Mundial de París donde observó varios peces eléctricos vivos que se exhibían, de la especie *Torpedo marmarota*. Estas rayas tienen órganos eléctricos que producen fuertes descargas (40-60 voltios) capaces de matar presas potenciales. En ese momento, Nachmansohn estaba estudiando la enzima acetilcolina esterasa, que actúa para destruir la ACh después de su liberación de las puntas de los nervios motores. Nachmansohn estaba al tanto de que los órganos eléctricos de estos peces se derivaban del tejido muscular esquelético modificado (véase figura 1) y preguntó si podría tener un par de peces para estudiar, una vez que la feria hubiera terminado. Los resultados de la primera prueba mostraron que el órgano eléctrico era una fuente extraordinariamente rica de acetilcolinesterasa.[3] También era una fuente muy rica el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR, *nicotinic acetylcholine receptor*),* presente en las membranas postsinápticas de las células del músculo esquelético que enlaza las moléculas de ACh liberadas de las puntas de un nervio motor. Encontrar un sistema ideal puede ser inapreciable para el estudio de un aspecto particular de la estructura o función celular. Como se hará evidente a partir de esta discusión, los órganos eléctricos de los peces han sido virtualmente la única fuente de material para el estudio de la nAChR.

La nAChR es una proteína de membrana integral, y no fue hasta la década de 1970 que se desarrollaron técnicas para el aislamiento de tales proteínas. Como se discutió en el capítulo 18, la purificación de una proteína particular requiere un experimento adecuado para determinar la cantidad de esa proteína presente en cualquier fracción particular. El experimento ideal para la nAChR fue un compuesto que se unió selectiva y estrechamente a esta proteína en particular. Tal compuesto fue descubierto en 1963 por Chen-Yuan Lee y sus colegas de la Universidad Nacional de Taiwán. El compuesto era la-bungarotoxina, una sustancia presente en el veneno de una serpiente taiwanesa. La α-bungarotoxina causa parálisis al unirse estrechamente a las nAChR en la membrana postsináptica de las células del músculo esquelético, lo que bloquea la respuesta del músculo a la ACh.[4]

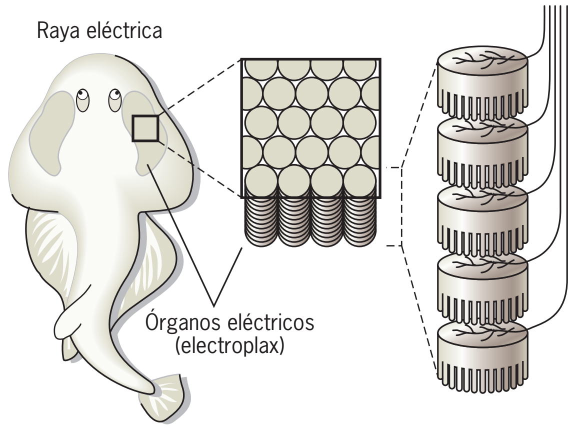



**FIGURA 1 Los órganos eléctricos de Torpedo consisten en apilamientos de uniones neuromusculares modificadas localizadas a cada lado del cuerpo.**

FUENTE: De Z. W. Hall, *An Introduction to Neurobiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA © 1992.

Equipados con α-bungarotoxina marcada para utilizar en un experimento, órganos eléctricos como fuente, y un detergente capaz de solubilizar proteínas de membrana, varios investigadores pudieron aislar los receptores de acetilcolina a principios de los años setenta. En uno de estos estudios[5] las membranas que contenían nAChR se aislaron homogeneizando los órganos eléctricos en un mezclador, y se centrifugó la suspensión para sedimentar los fragmentos de membrana. Las proteínas de membrana se extrajeron de los fragmentos de membrana usando Tritón X-100 (página 126), y la mezcla se pasó a través de una columna que contenía pequeñas perlas recubiertas con un compuesto sintético, cuyo extremo tiene un parecido estructural con la ACh (véase **FIGURA 2*a***). A medida que la mezcla de proteínas disueltas pasaba a través de la columna, dos proteínas que tienen sitios de unión para la acetilcolina, la nAChR y la acetilcolinesterasa (AChE, *acetylcholinesterase*), se adhirieron a las perlas. 90 por ciento restante de la proteína en el extracto no se unió a las perlas, y simplemente pasó a través de la columna y se recolectó (consúltese figura 2*b*). Una vez que este grupo de proteínas había pasado, se pasó una solución de 10-3 M de flaxedil a través de la columna, que eliminó selectivamente el nAChR de las perlas y dejó atrás la AChE. Con este procedimiento el receptor de acetilcolina medido por el enlace de bungarotoxina se purificó en más de 150 veces en un solo paso. Este tipo de procedimiento se conoce como *cromatografía de afinidad*, y su uso general se trata en la sección 18.11.

El siguiente paso fue determinar algo sobre la estructura del receptor de acetilcolina. Los estudios en el laboratorio de Arthur Karlin, en la Universidad de Columbia, determinaron que el nAChR era un pentámero, una proteína que consta de cinco subunidades. Cada receptor contenía dos copias de una subunidad llamada α, y una copia de cada una de las otras tres subunidades. Las subunidades se pueden distinguir extrayendo proteínas de membrana en Tritón X-100, purificando el nAChR mediante cromatografía de afinidad, y luego sometiendo la proteína purificada a electroforesis a través de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE como se discute en la sección 18.13), que separa los polipéptidos individuales de acuerdo con el tamaño (véase **FIGURA 3**).[6] Las cuatro subunidades diferentes demostraron ser homólogas entre sí, cada subunidad con cuatro hélices transmembrana homólogas (M1-M4).

* El receptor se describe como nicotínico porque puede ser activado tanto por la nicotina como por la acetilcolina. Esto contrasta con los receptores de acetilcolina muscarínicos de las sinapsis nerviosas parasimpáticas, que pueden ser activados por la muscarina pero no por la nicotina; la atropina los inhibe, no así el curare. Los cuerpos de los fumadores se acostumbran a altos niveles de nicotina, y experimentan síntomas de abstinencia cuando dejan de fumar porque las neuronas postsinápticas que poseen nAChR ya no son estimuladas a su nivel habitual. El medicamento Chantix, que se comercializa como una ayuda para dejar de fumar, actúa uniéndose a la versión más común de la nAChR cerebral (una con subunidades $\alpha 4\beta 2$). Una vez unida la molécula de Chantix estimula parcialmente el receptor y evita la unión de la nicotina.

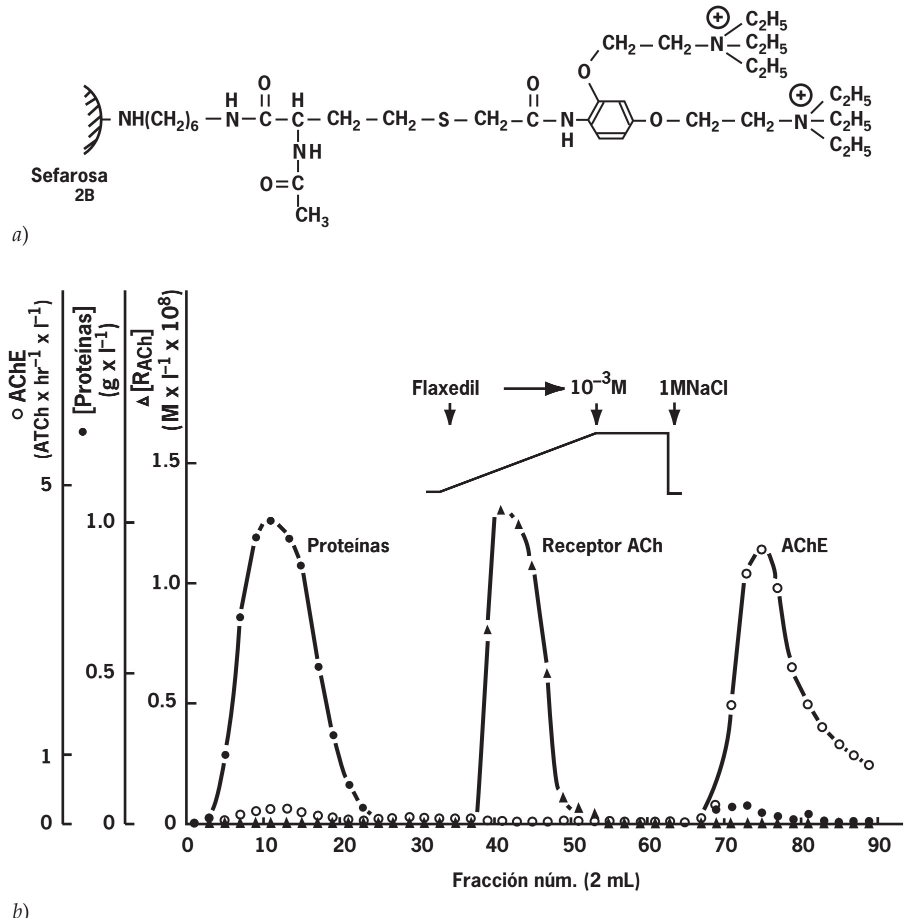



**FIGURA 2 Pasos usados en el aislamiento del nAChR.** *a*) Estructura del compuesto sintético CT5263, que se unió a perlas de sefarosa para formar una columna de afinidad. Los extremos del compuesto que sobresalen de las perlas se parecen a la acetilcolina, y hace que tanto la acetilcolinesterasa (AChE) como el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) se unan a las perlas. *b*) Cuando se pasó el extracto de Tritón X-100 a través de la columna, ambas proteínas de unión a la acetilcolina se adhirieron a las perlas, mientras que la proteína disuelta restante (aproximadamente 90% de la proteína total en el extracto) pasó directamente a través de la columna. El paso subsiguiente de una solución de $10^{-3}$ M de flaxedil a través de la columna liberó el nAChR unido sin alterar a la AChE unida (que posteriormente se lavó con NaCl 1 M).

FUENTE: *a*) De R. W. Olsen, J. -C. Meunier y J. -P. Changeux. *FEBS Lett* 1972;28:99. © 1972, con permiso de Elsevier.

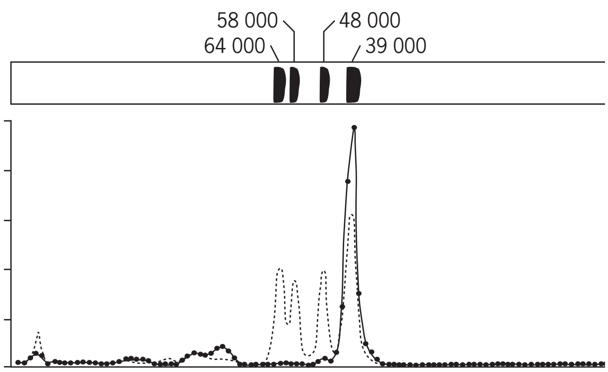



**FIGURA 3 La porción superior de la figura muestra un gel de SDS-poliacrilamida tras la electroforesis de una preparación de nAChR purificado.** El receptor consiste en cuatro subunidades diferentes cuyos pesos moleculares están indicados. Antes de la electroforesis, la preparación del receptor purificado se incubó con un compuesto radioactivo (3H-MBTA) que se parece a la acetilcolina, y se une al sitio de unión a la acetilcolina del nAChR. Después de la electroforesis, el gel se cortó en secciones de 1 mm y se determinó la radioactividad de cada corte. Toda la radioactividad se enlazó a la subunidad de 39 000 dalton, lo que indica que esta subunidad contiene el sitio de unión a la ACh. La línea punteada indica la absorbancia luminosa de cada fracción, que proporciona una medida de la cantidad total de proteína presente en esa fracción. Las alturas de los picos proporcionan una medida de las cantidades relativas de cada una de las subunidades en la proteína. Todas las subunidades están presentes en números iguales, excepto la subunidad más pequeña (la subunidad α, que contiene el sitio de unión de la ACh), que está presente en el doble del número de copias.

FUENTE: De CL Weill, MG McNamee, y A Karlin, Biochem. *Biophys Res Commun* 1974;61:1002, reproducido con permiso de Elsevier.

Otro hito importante en el estudio del nAChR fue la demostración de que el receptor purificado actuaba como un sitio para unir Ach y como un canal para el paso de cationes. Años atrás, Jean-Pierre Changeux, del Instituto Pasteur en París, había postulado que la unión de ACh al receptor causaba un cambio conformacional que abría un canal iónico dentro de la proteína. El flujo hacia dentro de los iones de $Na^+$ a través del canal podría conducir a una despolarización de la membrana, y a la activación de la célula muscular. Durante la última mitad de la década de 1970, Changeux y sus colegas lograron incorporar moléculas purificadas de nAChR en vesículas lipídicas artificiales.[7] Usando vesículas que contenían varias concentraciones de iones sodio y potasio marcados, demostraron que la unión de ACh a los receptores en la bicapa lipídica iniciaba un flujo de cationes a través de la "membrana". Resultó evidente que "la proteína pura de hecho contiene todos los elementos estructurales necesarios para la transmisión química de una señal eléctrica; es decir, un sitio de unión de acetilcolina, un canal iónico y un mecanismo para acoplar su actividad". La narración personal del trabajo inicial sobre el nAChR se puede encontrar en la referencia 8.

A partir de ese momento, los investigadores se han centrado en determinar la estructura del nAChR y el mecanismo por el cual la unión de la acetilcolina induce la apertura de la compuerta de iones. El análisis de la estructura ha tomado varios caminos diferentes. En un enfoque los científicos han usado genes purificados, determinación de secuencias de aminoácidos, y mutagénesis dirigida al sitio, para determinar las partes específicas de los polipéptidos que abarcan la membrana, o se unen al neurotransmisor, o forman el canal iónico. Estos estudios no cristalográficos sobre la anatomía molecular de una proteína son similares en principio a los descritos en la sección 4.5.

Otro enfoque empleó el microscopio electrónico. Los primeros destellos del nAChR se observaron en micrografías electrónicas de las membranas de los órganos eléctricos (consúltese

(*continúa*)

**FIGURA 4**).[9] Los receptores parecían tener forma de anillo, con un diámetro de 8 nm y un canal central de 2 nm de diámetro, y sobresalían de la bicapa lipídica hacia el espacio externo. Un modelo cada vez más detallado del nAChR ha sido desarrollado por Nigel Unwin y sus colegas del Medical Research Council of England.[10-14] Estos investigadores emplearon la técnica de la cristalografía electrónica (consúltese sección 18.16), que implica un análisis matemático de grandes cantidades de micrografías electrónicas de membranas congeladas que contienen las proteínas que se estudian. Los órganos eléctricos son muy adecuados para la cristalografía de electrones, porque contienen colecciones altamente ordenadas (cristalinas) del nAChR dentro del plano de la bicapa lipídica. Como resultado, Unwin pudo analizar la estructura de nAChR tal como existe en su entorno lipídico nativo. Describió la disposición de las cinco subunidades alrededor de un canal central (consúltese **FIGURA 5**). El canal iónico consiste en un poro estrecho alineado por una pared compuesta de cinco hélices α internas (M2), una por cada una de las subunidades circundantes. La compuerta hacia el poro se encuentra cerca del centro de la membrana, donde cada una de las α hélices M2 se dobla hacia adentro (en el vértice de las barras en forma de V en la figura 5*a*) para formar un pliegue en el receptor inactivado. La cadena lateral de un residuo de leucina se proyecta hacia adentro desde cada curvatura. En este modelo los residuos de leucina de las cinco hélices internas forman un anillo hidrofóbico hermético, que evita que los iones crucen la membrana. La compuerta se abre siguiendo la unión de dos moléculas ACh, una por subunidad α. Cada ACh se une a un sitio ubicado dentro de una cavidad de una subunidad α (véase figura 5*b*).

Para estudiar los cambios en el nAChR durante la apertura del canal, Unwin llevó a cabo el siguiente experimento.12 Se aplicaron preparaciones de membranas ricas en nAChR a una rejilla de soporte que se dejó caer en un baño de etano líquido refrigerado con nitrógeno, que congela las membranas. Aproximadamente 5 ms antes de llegar a la superficie del baño de congelación, las rejillas se rociaron con una solución de ACh, que se unió a los receptores y provocó el cambio conformacional necesario para abrir el canal. Al comparar las micrografías electrónicas de nAChR atrapadas en el estado abierto *versus* el cerrado, Unwin encontró que la unión de ACh generaba un pequeño cambio conformacional en los dominios extracelulares de las subunidades receptoras, cerca de los dos sitios de unión a ACh. Este cambio conformacional se propaga por la proteína, lo que hace que las hélices M2 que recubren el poro de la conducción iónica se enderecen (véase **FIGURA 6**), ensanchando el canal y exponiendo más residuos hidrofílicos, lo cual permite que los iones $Na^+$ entren en la célula.[13,14] Otros laboratorios han propuesto otros modelos para la apertura del canal, y una declaración más definida sobre el mecanismo de la activación probablemente requerirá una estructura cristalina de rayos X de alta resolución de la proteína, tanto en el estado abierto como en

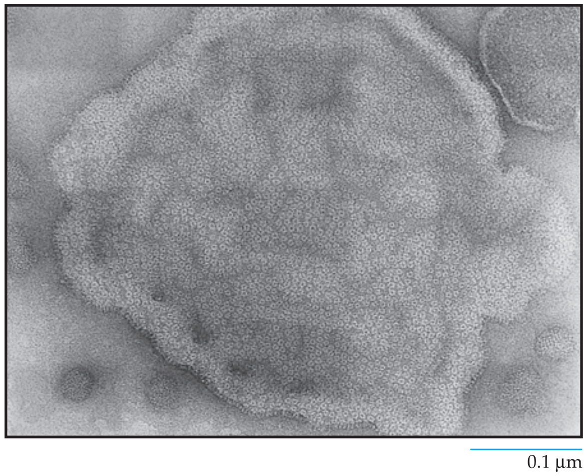
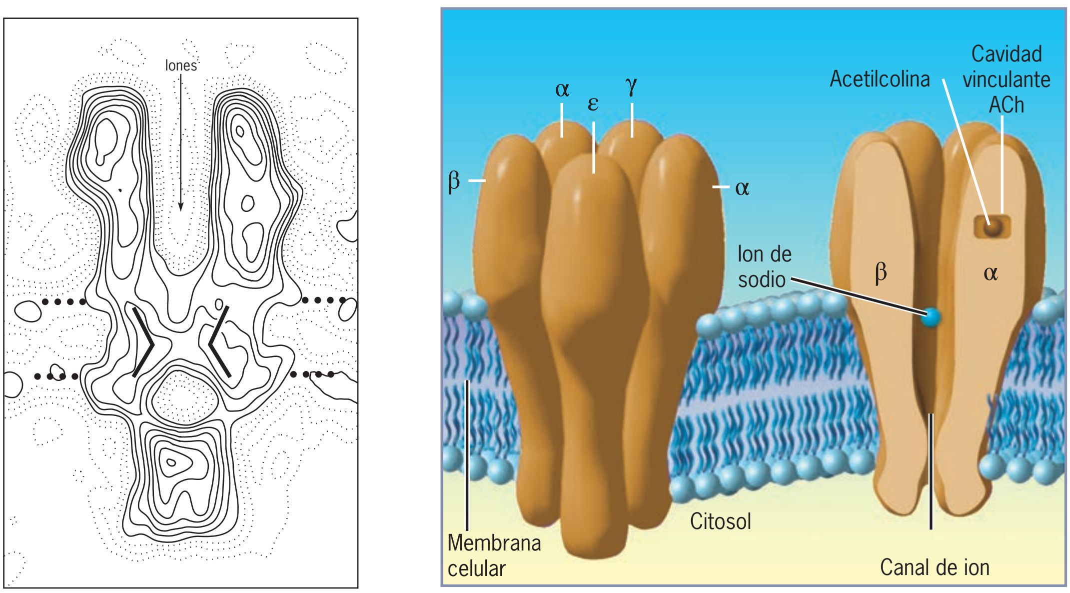



**FIGURA 4 Micrografía electrónica de membranas teñidas negativamente y ricas en receptores del órgano eléctrico de un pez eléctrico, que muestra la colección densa de moléculas nAChR**. Cada molécula receptora se ve como un pequeño círculo blanquecino con un pequeño punto negro en el centro; el punto corresponde al canal central, que ha recogido el teñido denso en electrones.

FUENTE: De Werner Schiebler y Ferdinand Hucho. *Eur J. Biochem* 1978;85:58, reimpreso con permiso John Wiley & Sons.




*a*) *b*)

**FIGURA 5** *a*) Mapa de densidad electrónica de un corte a través del nAChR, obtenido mediante el análisis de micrografías electrónicas de cristales tubulares de membranas de *Torpedo* incrustadas en hielo. Estos análisis han permitido a los investigadores reconstruir la apariencia tridimensional de una sola proteína nAChR como reside dentro de la membrana. Los contornos continuos indican líneas de similar densidad, mayor que la del agua. Las dos líneas oscuras en forma de barra representan las hélices α que recubren el canal en su punto más estrecho. *b*) Diagrama esquemático del nAChR que muestra la disposición de las subunidades y una representación de la sección transversal de la proteína. Cada una de las cinco subunidades contiene cuatro hélices que abarcan la membrana (M1-M4). De estas, solo la hélice interna (M2) recubre el poro y es el tema del resto de la discusión.

FUENTE: De N Unwin, *J Mol Biol* 1993;229:1118; © 1993, con permiso de Elsevier.

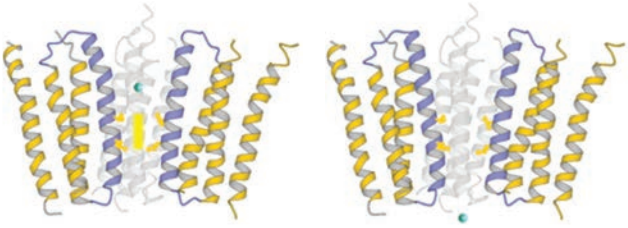



**FIGURA 6 Dibujos de cintas que ilustran los cambios que ocurren dentro del canal de conducción del nAChR al unirse a la acetilcolina.** Solo se muestran las dos subunidades alfa del receptor. En el estado cerrado (izquierda), el poro está bloqueado (parche amarillo) por la yuxtaposición cerrada de un anillo de residuos hidrofóbicos. El diámetro del poro en su punto más estrecho es de aproximadamente 6 Å, insuficiente para que pase un ion $Na^+$ hidratado. Esta constricción surge porque las hélices transmembrana internas están ligeramente dobladas. Aunque es suficientemente amplia como para pasar un ion $Na^+$ deshidratado (esfera azul), la pared del canal carece de los grupos polares que se requerirían para sustituir el caparazón desplazado de las moléculas de agua (como ocurre en el filtro de selectividad del canal $K^+$, véase figura 4-39). Después de la unión del ligando, un cambio conformacional en el dominio de unión del ligando de las subunidades alfa (no mostrado), hace que las hélices transmembrana internas de las subunidades (azul) se enderecen, se expande el diámetro del poro, lo que permite el flujo de $Na^+$ a través del canal abierto (derecha).

FUENTE: De N. Unwin. *Quart Rev Biophys* 2013;46:283.

el cerrado. La discusión de varios modelos y las bases para ellos se pueden encontrar en las referencias 15 a 17.

## Referencias


1. Langley J. N. On nerve endings and on special excitable substances in cells. *Proc R Soc London B Biol Sci* 1906.;78:170-194.
2. Loewi O. 1921. Uber humorale ubertragbarkeit der herznervenwirkung. *Pfluger's Arch* 214:239-242. (Una reseña del trabajo Loewi escrita por él en inglés puede ser encontrada en *Harvey Lect* 1933;28:218-233).
3. Marnay A. 1937. Cholinesterase dans l'organe électrique de la torpille. *Compte Rend.* 126:573-574. (Una reseña del trabajo de Nachmansohn escrita en inglés puede ser encontrada en su libro *Chemical and Molecular Basis of Nerve Action*, 2nd ed., Academic Press; 1975).
4. Chang C. C., Lee C-Y. 1963. Isolation of the neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 144:241-257.
5. Olsen R. W., Meunier J. C., Changeux J. P. 1972. Progress in the purification of the cholinergic receptor protein from Electrophorus electricus by affinity chromatography. *FEBS Lett* 28:96-100.
6. Weill C. L., Mcnamee M. G., Karlin A. 1974. Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochem Biophys Res Commun* 61:997-1003.
7. Popot J. L., Cartaud J., Changeux J. -P. 1981. Reconstitution of a functional acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 118:203-214.
8. Changeux J. P. 2010. Allosteric receptors: From electric organ to cognition. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 50:1-38.
9. Schiebler W., Hucho F. 1978. Membranes rich in acetylcholine receptor: Characterization and reconstitution to excitable membranes from exogenous lipids. *Eur J. Biochem* 85:55-63.
10. Brisson A., Unwin N. 1984. Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell Biol* 99:1202-1211.
11. Unwin N. 1993. Acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol Biol* 229:1101-1124.
12. Unwin N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37-43.
13. Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Unwin N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423: 949-955.
14. Unwin N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4.0 Å resolution. *J. Mol Biol* 346:967-989.
15. Corry B. 2006. An energy-efficient gating mechanism in the acetylcholine receptor channel suggested by molecular and brownian dynamics. *Biophys J.* 90:799-810.
16. Cymes G. D., Grosman C. 2008. Pore-opening mechanism of the nicotinic acetylcholine receptor evinced by proton transfer. *Nature Struct Mol Biol* 15:389-396.
17. Taly A., *et al.* 2009. Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Revs Drug Disc* 8:733-750.


## 4.13 Difusión facilitada

Las sustancias siempre se difunden a través de una membrana desde una región de mayor concentración en un lado a una región de menor concentración en el otro, pero no siempre se difunden a través de la bicapa lipídica o a través de un canal. En muchos casos la sustancia difusora se une primero selectivamente a una proteína que abarca toda la membrana, llamada **transportador facilitador**, que facilita el proceso de difusión. Se cree que la unión del soluto al transportador facilitador en un lado de la membrana desencadena un cambio conformacional en la proteína, exponiendo el soluto a la otra superficie de la membrana, desde donde puede difundirse por su gradiente de concentración. Este mecanismo se ilustra en la **FIGURA 4-44**. Debido a que operan pasivamente, es decir, sin estar acoplados a un sistema de liberación de energía, los transportadores facilitadores pueden mediar el movimiento de los solutos igualmente bien en ambas direcciones. La dirección del flujo neto depende de la concentración relativa de la sustancia en ambos lados de la membrana.

La **difusión facilitada**, como se llama este proceso, es similar en muchos aspectos a una reacción catalizada por enzimas. Al igual que las enzimas, los transportadores facilitadores son específicos para las moléculas que transportan; por ejemplo, discriminando entre los estereoisómeros D y L (página 43). Además, tanto las enzimas como los transportadores presentan una cinética tipo **saturación** (consúltese **FIGURA 4-45**). A diferencia de los canales iónicos, que pueden transportar millones de iones por segundo, la mayoría de los transportadores facilitadores pueden mover solo de cientos a miles de moléculas de soluto por segundo a través de la membrana, por lo que una vez que la concentración de iones es muy grande, la velocidad de transporte se nivela a este máximo valor, y se dice que los transportadores están saturados. Otra característica importante de los transportadores facilitadores es que, como las enzimas y los canales iónicos, su actividad puede regularse. La difusión facilitada es particularmente importante en la mediación de la entrada y salida de solutos polares como azúcares y aminoácidos, que no penetran en la bicapa lipídica. Esto se ilustra en la siguiente sección.

El transportador de glucosa es un ejemplo de difusión facilitada. La glucosa es la principal fuente de energía directa del cuerpo, y la mayoría de las células de mamíferos contienen una proteína de membrana que facilita la difusión de glucosa del torrente sanguíneo a la célula (como se muestra en las figuras 4-44 y 4-49). Se mantiene un gradiente que favorece la difusión continua de glucosa en la célula mediante la fosforilación del azúcar después de que ingresa al citoplasma, disminuyendo así la concentración

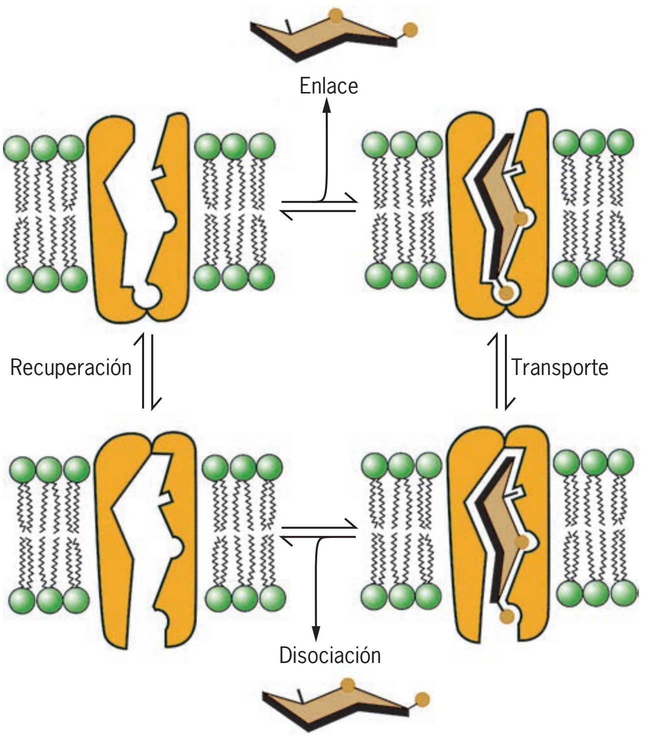



**FIGURA 4-44 Difusión facilitada.** Un modelo esquemático para la difusión facilitada de la glucosa representa la conformación alternante de un transportador, que expone el sitio de unión a la glucosa al interior o al exterior de la membrana.

FUENTE: Reimpreso de S. A. Baldwin y G. E. Lienhard, *Trends Biochem Sci* 1981;6:210. Utilizado con permiso de Elsevier, Ltd.

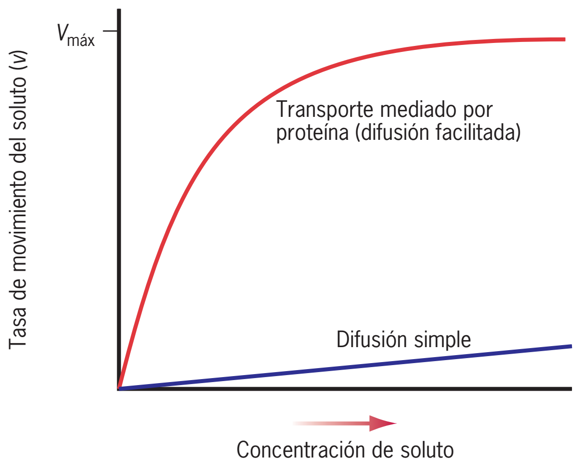



**FIGURA 4-45 Cinética de difusión facilitada en comparación con la de la difusión física simple.**

de glucosa intracelular. Los humanos tienen al menos cinco proteínas relacionadas (isoformas) que actúan como transportadores facilitadores de glucosa. Estas isoformas, denominadas GLUT1 a GLUT5, se distinguen por los tejidos en los que están ubicadas, así como por sus características cinéticas y reguladoras.

La insulina es una hormona, producida por las células endocrinas del páncreas, que desempeña un papel clave en mantener los niveles adecuados de azúcar en la sangre. Un aumento en los niveles de glucosa en sangre desencadena la secreción de insulina, que estimula la absorción de glucosa en varias células blanco, sobre todo en células músculoesqueléticas y adiposas (adipocitos). Las células que responden a la insulina comparten una isoforma común del transportador facilitador de glucosa, específicamente el GLUT4. Cuando los niveles de insulina son bajos, estas células contienen relativamente pocos transportadores de glucosa en su membrana plasmática. En cambio, los transportadores están presentes dentro de las membranas de las vesículas citoplasmáticas. Los niveles crecientes de insulina actúan sobre las células objetivo para estimular la fusión de las vesículas citoplásmicas a la membrana plasmática, lo que mueve los transportadores a la superficie celular, donde pueden llevar la glucosa a la célula (véase figura 15-26).

**REPASO**

1. Compare y correlacione los transportadores facilitadores con los canales.
2. Argumente por qué las enzimas y los transportadores muestran una cinética de saturación.

## 4.14 Transporte activo

La vida no puede existir en condiciones de equilibrio (véase sección 3.4). En ningún lugar es esto más evidente que en el desequilibrio de iones a través de la membrana plasmática. Las diferencias en la concentración de los principales iones entre el exterior y el interior de una célula de mamífero típica se muestran en la tabla 4-3. La capacidad de una célula para generar tales gradientes elevados de concentración a través de su membrana plasmática no se puede producir por difusión simple o facilitada. Por el contrario, estos gradientes deben generarse mediante **transporte activo**.

Al igual que la difusión facilitada, el transporte activo depende de proteínas integrales de membrana que se unen selectivamente a un soluto particular y lo mueven a través de la membrana en un proceso impulsado por cambios en la conformación de la proteína. Sin embargo, a diferencia de la difusión facilitada, el movimiento de un soluto contra un gradiente requiere la entrada acoplada de energía. En consecuencia, el movimiento endergónico de iones u otros solutos a través de la membrana contra un gradiente de concentración se acopla a un proceso exergónico, como la hidrólisis del ATP, la absorbancia de la luz, el transporte de electrones, o el flujo de otras sustancias por sus gradientes. Las proteínas que llevan a cabo el transporte activo a menudo se denominan "bombas".

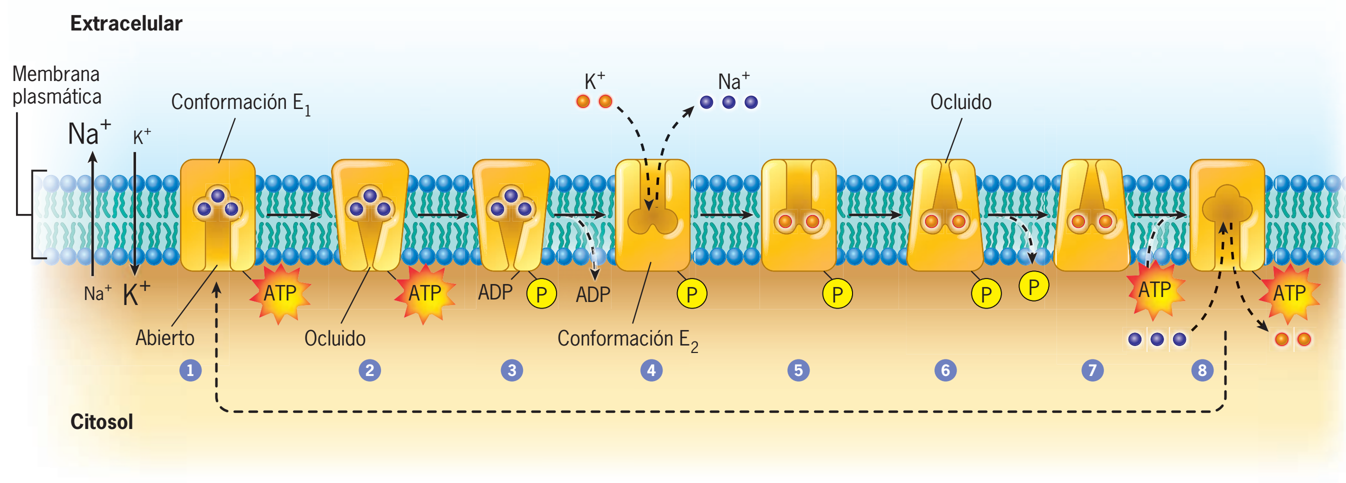
### Transporte activo primario: transporte de acoplamiento a la hidrólisis del ATP

En 1957 el fisiólogo danés Jens Skou descubrió una enzima que hidroliza el ATP de las células nerviosas del cangrejo, que solo estaba activa en presencia de iones $Na^+$ y $K^+$. Skou propuso —y correctamente— que esta enzima responsable de la hidrólisis de ATP era la misma proteína que estaba activa en el transporte

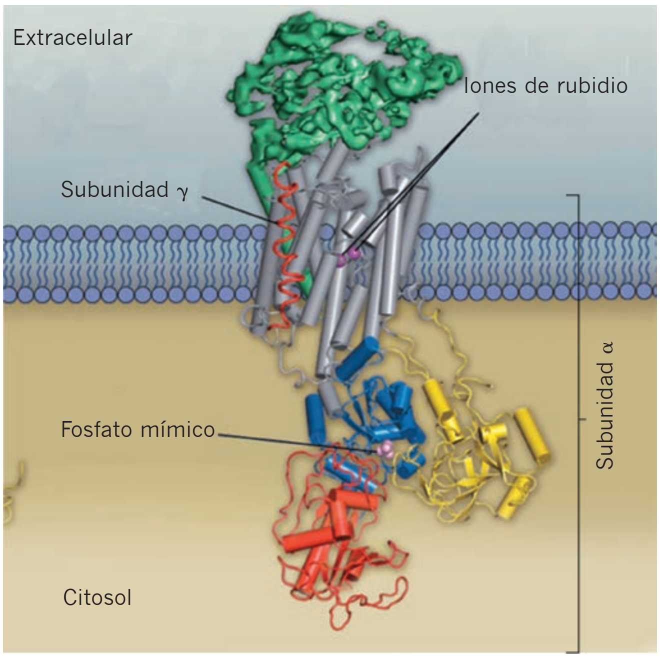
**TABLA 4-3 Concentraciones de iones dentro y fuera de una célula típica de mamífero**

| | Concentración extracelular | Concentración intracelular | Gradiente iónico |
|---|---|---|---|
| $Na^+$ | 150 mM | 10 mM | 15× |
| $K^+$ | 5 mM | 140 mM | 28× |
| $Cl^-$ | 120 mM | 10 mM | 12× |
| $Ca^{2+}$ | $10^{-3}$ M | $10^{-7}$ M | 10 000× |
| $H^+$ | $10^{-7.4}$ M (pH 7.4) | $10^{-7.2}$ M (pH 7.2) | Alrededor de 2× |

Las concentraciones de iones para el axón de calamar se dan en la página 167.




*a*)




*b*)

**FIGURA 4-46 La Na+/K+-ATPasa.** *a*) Modelo esquemático simplificado del ciclo de transporte, como se describe en el texto. Obsérvese que la Na+/K+-ATPasa real se compone de al menos dos subunidades diferentes que abarcan la membrana: una subunidad α mayor, que lleva a cabo la actividad de transporte, y una subunidad β más pequeña, que funciona principalmente en la maduración y ensamblaje de la bomba dentro de la membrana. Una tercera subunidad (ϒ) también puede estar presente. *b*) Un modelo de la conformación $E_2$ de la proteína con base en un estudio cristalográfico de rayos X. Los sitios de enlace de cationes están ubicados en el interior del dominio transmembrana, que consta de 10 hélices que abarcan la membrana. Los dos iones de rubidio se encuentran donde los iones de potasio estarían enlazados normalmente.

FUENTE: *b*) De Ayako Takeuchi, cortesía de David C. Gadsby, *Nature* 2007; 450:958, © 2007 reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

de esos dos iones; la enzima se llamó $Na^+/K^+$-ATPasa, o *bomba de sodio-potasio*.

A diferencia del movimiento mediado por proteínas de un sistema de difusión facilitado, que transporta la sustancia igualmente bien en cualquier dirección, el transporte activo impulsa el movimiento de iones en una sola dirección. La $Na^+/K^+$-ATPasa es la responsable del gran exceso de iones $Na^+$ fuera de la célula y del gran exceso de iones $K^+$ dentro de la célula. Las cargas positivas portadas por estos dos cationes se equilibran mediante cargas negativas portadas por diversos aniones, de modo que los compartimientos extracelular e intracelular son, en su mayor parte, eléctricamente neutros. Los iones $Cl^-$ están presentes a mayor concentración fuera de las células, donde equilibran los iones $Na^+$ extracelulares. La abundancia de iones $K^+$ intracelulares se equilibra principalmente por el exceso de cargas negativas que portan las proteínas y los ácidos nucleicos.

La relación $Na^+$:$K^+$ bombeada por la $Na^+/K^+$-ATPasa no es 1:1, sino 3:2 (véase **FIGURA 4-46**). En otras palabras, por cada ATP hidrolizado, se bombean tres iones de sodio a medida que se bombean dos iones de potasio. A causa de esta relación de bombeo, la $Na^+/K^+$-ATPasa es *electrogénica*, lo que significa que contribuye directamente a la separación de cargas a través la membrana. La $Na^+/K^+$-ATPasa es un ejemplo de bomba de iones *tipo P*. La "P" significa fosforilación, lo que indica que durante el ciclo de bombeo la hidrólisis del ATP conduce a la transferencia del grupo fosfato liberado hacia un residuo de ácido aspártico de la proteína de transporte. Como lo denota el nombre de la proteína, la propia bomba cataliza esta reacción.

Considérese la actividad de la proteína. Debe recoger iones de sodio o potasio de una región de baja concentración, lo que significa que la proteína debe tener una afinidad relativamente alta por los iones. Entonces la proteína debe liberar los iones en el otro lado de la membrana, en una concentración mucho mayor de cada ion. Para hacer esto, la afinidad de la proteína por ese ion debe disminuir. De aquí que la afinidad por cada ion en los dos lados de la membrana debe ser diferente. Esto se logra mediante la hidrólisis del ATP y la posterior liberación del ADP, que induce un gran cambio conformacional dentro de la molécula de proteína. El cambio en la estructura de la proteína —entre las conformaciones $E_1$ y $E_2$— también sirve para exponer alternativamente los sitios de unión de iones al lado opuesto de la membrana, como se analiza en el siguiente párrafo.

En la figura 4-46*a*) se muestra un esquema propuesto para el ciclo de bombeo de la $Na^+/K^+$-ATPasa, con base en las estructuras cristalográficas de rayos X de bombas de iones del tipo P. En el paso 1, figura 4-46*a*), la bomba está en la conformación $E_1$, y los sitios de unión de iones están accesibles al interior de la célula. En este paso la proteína ha unido tres iones $Na^+$ y un ATP. En el paso 2 se ha cerrado una compuerta dentro de la proteína, se ha desplazado la bomba a un estado $E_1$ ocluido, en el que los iones $Na^+$ ya no pueden volver a fluir hacia el interior del citosol. La

hidrólisis del ATP ligado (paso 2 → 3) y la liberación de ADP (paso 3 → 4) provocan el cambio de la conformación $E_1$ a $E_2$. Al hacerlo, el sitio de unión se vuelve accesible para el compartimiento extracelular, y la proteína pierde su afinidad por los iones $Na^+$, que luego se liberan fuera de la célula. Una vez que se han liberado los tres iones $Na^+$, la proteína capta dos iones $K^+$ (paso 5). El cierre de otra compuerta dentro de la proteína desplaza la bomba a un estado ocluido (paso 6) y se impide el flujo de retorno de los iones $K^+$ en el espacio extracelular. A la oclusión le sigue la desfosforilación (paso 6 → 7) y la unión a ATP (paso 8), que induce el retorno de la proteína a la conformación $E_1$ original. En este estado, el sitio de unión está abierto a la superficie interna de la membrana, y ha perdido su afinidad por los iones $K^+$, lo que lleva a la liberación de estos iones en la célula. A continuación, se repite el ciclo. En la figura 4-46*b*) se muestra un modelo de la estructura cristalina de la estructura $Na^+/K^+$-ATPasa. Debido a que requieren cambios conformacionales complejos, estas bombas de transporte activo mueven iones a través de las membranas a velocidades que son varios órdenes de magnitud más bajas que su flujo a través de los canales iónicos.

La bomba de sodio-potasio se encuentra solo en las células animales. Se piensa que esta proteína evolucionó en los animales primitivos como medio principal de mantener el volumen celular, y como mecanismo para generar los pronunciados gradientes de $Na^+$ y $K^+$ que desempeñan un papel clave en la formación de impulsos en las células nerviosas y musculares. Estos mismos gradientes iónicos se usan en células no excitables para impulsar el movimiento de otros solutos, como se explica a continuación. La importancia de la bomba de sodio-potasio se hace evidente cuando se considera que consume aproximadamente un tercio de la energía producida por la mayoría de las células animales, y dos tercios de la energía producida por las células nerviosas. El digital, un esteroide obtenido de la planta *digitalis purpurea* que se ha utilizado durante 200 años como tratamiento para la enfermedad cardiaca congestiva, se enlaza a la $Na^+/K^+$-ATPasa. El digital refuerza la contracción del corazón al inhibir la bomba $Na^+/K^+$, lo que conduce a una cadena de eventos que aumenta la disponibilidad de $Ca^{2+}$ dentro de las células musculares del corazón.

## Otros sistemas primarios de transporte de iones

La bomba de tipo P mejor estudiada es la $Ca^{2+}$-ATPasa, cuya estructura tridimensional se ha determinado en varias etapas del ciclo de bombeo. La bomba de calcio está presente en las membranas del retículo endoplásmico, donde transporta activamente los iones de calcio del citosol hacia la luz de este organelo. Las células vegetales tienen una bomba de membrana plasmática tipo P de transporte de $H^+$. En las plantas esta bomba de protones desempeña un papel clave en el transporte secundario de solutos (discutido más adelante), en el control del pH citosólico y posiblemente en el control del crecimiento celular por medio de la acidificación de la pared celular de la planta.

El revestimiento epitelial del estómago también contiene una bomba de tipo P, la $H^+/K^+$-ATPasa, que secreta una solución de ácido concentrado (hasta 0.16 N HCl) en la cámara del estómago. En estado de reposo estas moléculas de bomba están situadas en membranas citoplásmicas de las células parietales del revestimiento del estómago. y no son funcionales (consúltese **FIGURA 4-47**). Cuando la comida ingresa al estómago se transmite un mensaje hormonal a las células parietales, que hace que las membranas que contienen la bomba se desplacen a la superficie apical de la célula, donde se fusionan con la membrana plasmática y comienzan a secretar ácido (véase figura 4-47). Además de funcionar en la digestión, el ácido del estómago también puede conducir a la acidez estomacal. El Prilosec y otros medicamentos relacionados son muy utilizados para prevenir la acidez gástrica al inhibir la $H^+/K^+$-ATPasa del estómago. Otros medicamentos para la acidez estomacal que bloquean el ácido (p. ej., Zantac, Pepcid y Tagamet) no inhiben directamente la $H^+/K^+$-ATPasa, pero bloquean un receptor en la superficie de las células parietales, y así impiden que las células se activen con la hormona.

A diferencia de las bombas de tipo P, las bombas de *tipo V* utilizan la energía del ATP sin formar una proteína fosforilada intermedia. Las bombas de tipo V transportan activamente iones de hidrógeno a través de las paredes de los organelos y vacuolas del citoplasma (de ahí la designación tipo V). Aparecen en las

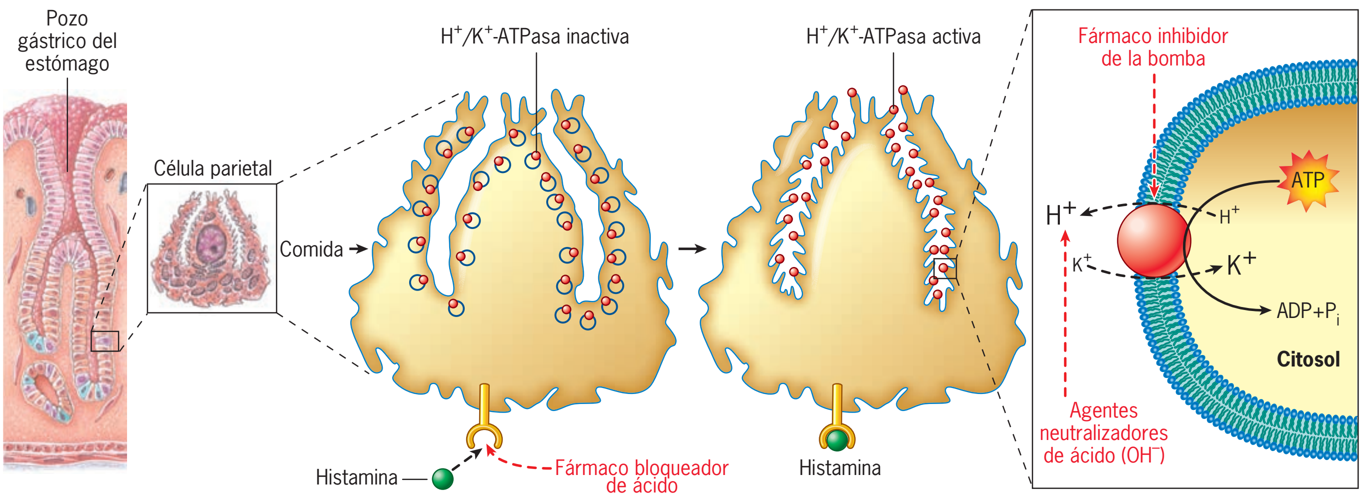



**FIGURA 4-47 Control de la secreción ácida en el estómago.** En el estado de reposo, las moléculas la $H^+/K^+$-ATPasa están presentes en las paredes de las vesículas citoplásmicas. La comida que ingresa al estómago desencadena una cascada de reacciones estimuladas por hormonas en la pared del estómago que conducen a la liberación de histamina, la que se une a un receptor en la superficie de las células parietales que secretan ácido. La unión de la histamina a su receptor estimula una respuesta que hace que las vesículas que contienen la $H^+/K^+$-ATPasa se fusionen a la membrana plasmática, formando pliegues profundos o canalículos. Una vez en la superficie la proteína de transporte se activa, y bombea protones a la cavidad del estómago contra un gradiente de concentración (indicado por el tamaño de las letras). Los medicamentos para la acidez estomacal Prilosec, Nexium y Prevacid bloquean la secreción de ácido al inhibir directamente la $H^+/K^+$-ATPasa, mientras que otros medicamentos bloqueadores de ácido interfieren con la activación de las células parietales. Los medicamentos neutralizadores de ácido proporcionan aniones básicos que se combinan con los protones secretados.

membranas que recubren los lisosomas, los gránulos secretores y las vacuolas de las células vegetales, donde mantienen el bajo pH de los contenidos. También se han encontrado bombas de tipo V en las membranas plasmáticas de una variedad de células. Por ejemplo, una bomba de tipo V en las membranas plasmáticas de los túbulos renales ayuda a mantener el equilibrio ácido-base del cuerpo, al secretar protones en la orina en formación. Las bombas de tipo V son grandes complejos de múltiples subunidades (se muestran en la figura 4-4*d*), y tienen una estructura similar a la ATP sintasa mostrada en la figura 5-23.

Otro grupo diverso de proteínas que transportan iones activamente es el *transportador de casete ATP-enlazante* (ABC, *ATP-binding cassette*), denominado así porque todos los miembros de esta superfamilia comparten un dominio homólogo ATP-enlazante. El transportador ABC mejor estudiado se describe en la “Perspectiva humana” adjunta.

## El uso de la energía luminosa para transportar iones activamente

La *Halobacterium salinarium* (o *H. halobium*) es una arqueobacteria que vive en ambientes extremadamente salados, como el que se encuentra en el Gran Lago Salado. Cuando crece en condiciones anaeróbicas, las membranas plasmáticas de estas bacterias adquieren un color púrpura debido a la presencia de una proteína particular, la bacteriorodopsina, que actúa como una bomba de protones accionada por la luz. Como se muestra en la **FIGURA 4-48**, la bacteriorodopsina contiene retinal, el mismo grupo prostético presente en la rodopsina, la proteína que absorbe la luz en los bastones de la retina de los vertebrados. La absorción de la energía luminosa por parte del grupo retinal induce una serie de cambios conformacionales en la proteína, que hacen que un protón se mueva desde el grupo retinal —a través de un canal en la proteína— hacia el exterior de la célula (véase figura 4-48). El protón donado por la retina fotoactivada se reemplaza por otro protón transferido a la proteína del citoplasma. En total este proceso da como resultado la translocación de protones del citoplasma al ambiente externo, lo cual genera un pronunciado gradiente de $H^+$ a través de la membrana plasmática. Este gradiente se utiliza más adelante por una enzima que sintetiza ATP para fosforilar el ADP, como se describe en el siguiente capítulo.

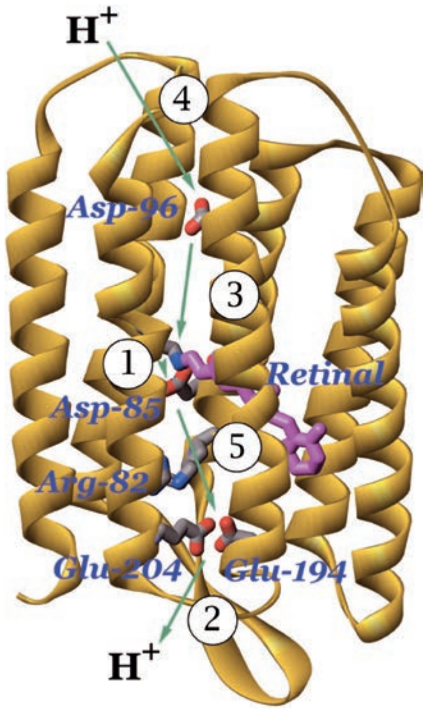



**FIGURA 4-48 Bacteriorodopsina: una bomba de protones accionada por luz.** La proteína contiene siete hélices que abarcan toda la membrana y un grupo retinal ubicado en el centro (que se muestra en color púrpura), que sirve como elemento absorbente de la luz (cromóforo). La absorción de un fotón causa un cambio en la estructura electrónica de la retina, lo que lleva a la transferencia de un protón desde grupo —$NH^+$ a un residuo de ácido aspártico estrechamente asociado, cargado negativamente (núm. 85) (paso 1). El protón se libera en el lado extracelular de la membrana (paso 2) mediante un sistema de traspaso que consiste en varios residuos de aminoácidos (Asp82, Glu204 y Glu194). Los espacios entre estos residuos están llenos de moléculas de agua ligadas al hidrógeno, que ayudan a transportar protones a lo largo del camino. El retinal sin esos protones vuelve a su estado original (paso 3) cuando acepta un protón de un residuo de ácido aspártico no asociado (Asp96), localizado cerca del lado citoplásmico de la membrana. Después el Asp96 gana un protón por un $H^+$ del citoplasma (paso 4). Él pierde un protón (paso 5) antes de recibir un protón de la retina en el siguiente ciclo de bombeo. Como resultado de estos eventos, los protones se mueven desde el citoplasma al exterior de la célula a través de un canal central en la proteína.

FUENTE: De Hartmut Luecke *et al.*, cortesía de Janos K. Lanyi, *Science* 1999;286:255; © 1 999, reimpreso con permiso de AAAS.

## Transporte activo secundario (o cotransporte): acoplamiento del transporte activo con los gradientes iónicos existentes

El establecimiento de gradientes de concentración como los de $Na^+$, $K^+$ y $H^+$ proporciona un medio por el cual se puede almacenar energía libre en una célula. La energía potencial almacenada en los gradientes iónicos es utilizada por una célula de diversas maneras para realizar trabajo, incluido el transporte de otros solutos. Considérese la actividad fisiológica del intestino. Dentro de su lumen, las enzimas hidrolizan polisacáridos de alto peso molecular en azúcares simples, que absorben las células epiteliales que recubren el intestino. El movimiento de la glucosa a través de la membrana plasmática apical de las células epiteliales, en contra de un gradiente de concentración, se produce por **cotransporte** con iones de sodio, como se ilustra en la **FIGURA 4-49**. La concentración de $Na^+$ se mantiene muy baja dentro de las células por acción de un sistema de transporte activo *primario* ($Na^+/K^+$-ATPasa), ubicado en la membrana plasmática basal y lateral, que bombea iones de sodio fuera de la célula contra un gradiente de concentración. La tendencia de los iones de sodio a difundirse hacia atrás a través de la membrana plasmática apical —en favor de su gradiente de concentración— es “conducida” ligeramente por las células epiteliales para conducir el cotransporte de moléculas de glucosa hacia la célula *en contra* del gradiente de concentración. Se dice que las moléculas de glucosa son impulsadas por el *transporte activo secundario*. En este caso la proteína de transporte, llamada *cotransportador $Na^+$/glucosa*, mueve dos iones de sodio y una molécula de glucosa en cada ciclo. Una vez adentro las moléculas de glucosa se difunden a través de la célula, y se mueven a través de la membrana basal mediante difusión facilitada (página 152).

Para apreciar el poder de un gradiente de iones de acumular otros tipos de solutos en las células, podemos considerar brevemente la energética del cotransportador $Na^+$/glucosa. Recuérdese, de la página 140, que el cambio de energía libre para el movimiento de 1 mol de iones $Na^+$ en la célula es igual a –3.1 kcal/mol, y por tanto 6.2 kcal para dos moles de iones $Na^+$, que estarían disponibles para transportar 1 mol de glucosa cuesta arriba en la célula. Recuérdese también, de la página 139, que la ecuación para el movimiento de un no electrólito —como la glucosa— a través de la membrana es

$$\Delta G = RT \ln\frac{[C_i]}{[C_o]}$$

$$\Delta G = 2.303\ RT \log_{10}\frac{[C_i]}{[C_o]}$$

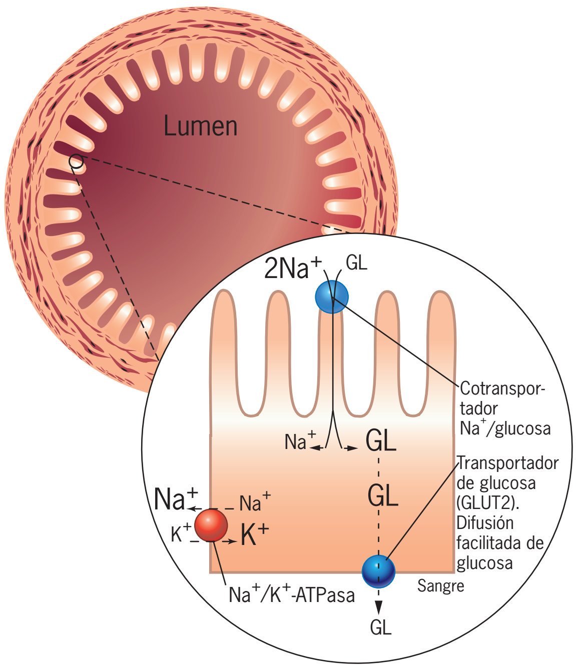



**FIGURA 4-49 Transporte secundario: uso de energía almacenada en un gradiente iónico.** La $Na^+$/$K^+$-ATPasa que reside en la membrana plasmática de la superficie lateral mantiene una concentración citosólica muy baja de Na+. El gradiente de $Na^+$ a través de la membrana plasmática representa un almacenamiento de energía que se puede aprovechar para realizar un trabajo, como el transporte de glucosa mediante un cotransportador $Na^+$/glucosa localizado en la membrana plasmática apical. Una vez que se transportan a través de la superficie apical hacia la célula, las moléculas de glucosa se difunden a la superficie basal, donde son transportadas por un transportador facilitador de glucosa fuera de la célula y hacia el torrente sanguíneo. El tamaño relativo de las letras indica las direcciones de los respectivos gradientes de concentración. Cada molécula de glucosa transporta dos iones $Na^+$; la $Na^+$/glucosa 2:1 proporciona una fuerza motriz mucho mayor para mover la glucosa a la célula que una relación 1:1.

Usando esta ecuación, podemos calcular qué tan pronunciada es la concentración de glucosa ($X$) que este cotransportador puede generar. A 25 °C,

$$-6.2 \text{ kcal/mol} = 1.4 \text{ kcal/mol} \cdot \log_{10} X$$
$$\log_{10} X = -4.43$$
$$X = \frac{1}{23\,000}$$

Este cálculo indica que el cotransportador $Na^+$/glucosa es capaz de transportar glucosa a una célula contra un gradiente con concentración 20 000 veces mayor.

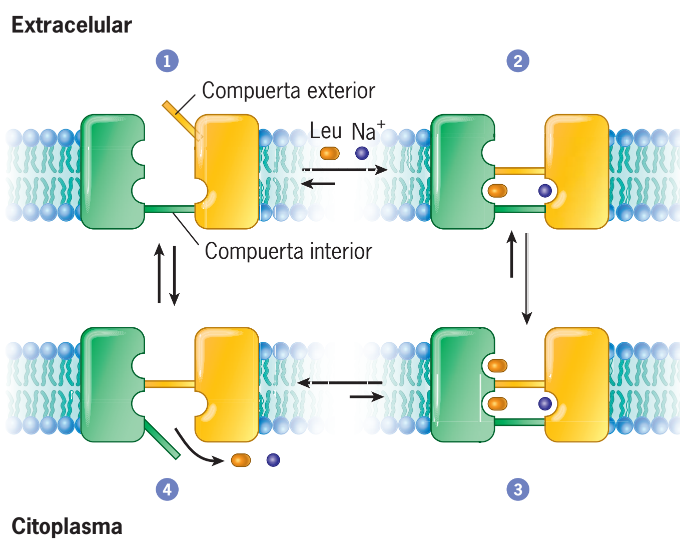
**FIGURA 4-50 Modelo esquemático del ciclo de transporte de un transportador secundario.** Se muestran cuatro estados conformacionales diferentes durante el ciclo de transporte de un simportador bacteriano de la familia LeuT. La proteína transporta activamente el aminoácido leucina a la célula utilizando el gradiente de iones $Na^+$ establecido como fuente de energía. En el paso 1 la compuerta externa en la proteína está abierta, lo que permite que tanto el $Na^+$ como la leucina lleguen a sus sitios de enlace desde el espacio extracelular. En el paso 2 la compuerta exterior se cierra y se ocluyen los sustratos dentro de la proteína. En el paso 3 una segunda molécula de leucina se une a otro sitio justo fuera de la compuerta exterior. En el paso 4 la compuerta interior se abre y los sustratos se liberan en el citoplasma. La proteína vuelve a su estado original cuando se cierra la compuerta interior y se abre la compuerta exterior.

FUENTE: Reproducida con permiso de Macmillan Publishers Ltd: *Nature* 2010;465:171, por N. K. Karpowich y Da-Neng Wang (NYU School of Medicine).

Las células vegetales dependen de sistemas secundarios de transporte activo para absorber una variedad de nutrientes que incluyen sacarosa, aminoácidos y nitrato. En las plantas la absorción de estos compuestos se combina con el movimiento descendente hacia adentro de los iones $H^+$, en lugar de los iones $Na^+$. El transporte secundario activo de glucosa a las células epiteliales del intestino y el transporte de sacarosa a una célula vegetal son ejemplos de *simportadores*, donde las dos especies transportadas ($Na^+$ y glucosa, o $H^+$ y sacarosa) se mueven en la misma dirección. Se han aislado numerosos cotransportadores asociados a un ***antiportador***, donde las dos especies transportadas se mueven en direcciones opuestas. Por ejemplo, a menudo las células mantienen un pH citoplasmático adecuado al acoplar el movimiento hacia adentro y hacia abajo del $Na^+$ con el movimiento hacia afuera del $H^+$. Los cotransportadores que median el antiporte son por lo general llamados *intercambiadores*. En los últimos años se han resuelto las estructuras tridimensionales de varios transportadores secundarios y, como la $Na^+$/$K^+$-ATPasa, exhiben un ciclo de transporte en el que los sitios de unión de la proteína obtienen un acceso alterno al citoplasma y al espacio extracelular. En la **FIGURA 4-50** se muestra un modelo propuesto del ciclo de transporte de una de las principales familias de transportadores secundarios.

## REPASO

1. Describa dos formas en que se utiliza la energía para mover iones y solutos contra un gradiente de concentración.
2. ¿Cómo ilustra la Na+/K+-ATPasa la asimetría de la membrana plasmática?
3. ¿Cuál es el papel de la fosforilación en el mecanismo de acción de $Na^+$/$K^+$-ATPasa?
4. ¿Cuál es la relación estructural entre las partes del canal procariótico KcsA $K^+$ y el canal de $K^+$ regulado por voltaje eucariótico? ¿Qué parte del canal está involucrada en la selectividad iónica, qué parte en la activación del canal y qué parte en la inactivación del canal? ¿Cómo ocurre cada uno de estos procesos (selectividad iónica, activación e inactivación)?
5. Debido a su menor tamaño, se esperaría que los iones de $Na^+$ pudieran penetrar cualquier poro lo suficientemente grande para un ion $K^+$. ¿Cómo selecciona el canal $K^+$ este ion específico?



# 4.15 PERSPECTIVA HUMANA

## Defectos en los canales iónicos y transportadores como causa de enfermedades hereditarias

Varios trastornos hereditarios graves se han rastreado hasta mutaciones en genes que codifican proteínas de canales iónicos (consúltese tabla 1). La mayoría de los trastornos enumerados en la tabla 1 afectan el movimiento de iones a través de las membranas plasmáticas de células excitables (es decir, músculos, nervios y células sensoriales), lo que reduce la capacidad de estas células para desarrollar o transmitir impulsos (página 160). En contraste la fibrosis quística, el trastorno del canal iónico hereditario más estudiado y más común, es el resultado de un defecto en los canales iónicos de las células epiteliales.

En promedio, una de cada 25 personas provenientes del norte de Europa portan una copia del gen mutante que puede causar fibrosis quística. Como no muestran síntomas del gen mutante, la mayoría de los heterocigotos desconocen que son portadores. En consecuencia, aproximadamente uno de cada 2 500 niños de esta población caucásica (1/25 × 1/25 × 1/4) es homocigoto recesivo en ese *locus* y nace con fibrosis quística (CF, *cystic fibrosis*). Aunque la fibrosis quística afecta a órganos como el intestino, el páncreas, las glándulas sudoríparas y el tracto reproductivo, el tracto respiratorio suele presentar los efectos más graves. Las víctimas de CF producen una mucosidad espesa y pegajosa, muy difícil de expulsar de las vías respiratorias. Las personas afectadas suelen padecer infecciones pulmonares crónicas e inflamación, que destruyen progresivamente la función pulmonar.

El gen responsable de la fibrosis quística se aisló en 1989. Una vez que se determinó la secuencia del gen CF y se dedujo la secuencia de aminoácidos del polipéptido correspondiente, era evidente que el polipéptido era un miembro de la superfamilia del transportador ABC. La proteína se nombró *regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator),* un término ambiguo que reflejaba el hecho de que los investigadores no estaban seguros de su función precisa. Se pensó que la pregunta se respondería después de purificar la proteína, incorporarla a las bicapas lipídicas artificiales, y demostrar que actuaba como un canal de cloruro regulado por AMP cíclico, no como un transportador. Pero estudios posteriores han agregado numerosas complicaciones a la historia, ya que se ha demostrado que además de funcionar como un canal de cloro, la CFTR también 1) contiene iones de bicarbonato ($HCO_3^-$) 2) suprime la actividad de un canal iónico de $Na^+$ epitelial, el canal iónico (ENaC) y 3) estimula la actividad de una familia de intercambiadores epiteliales de cloruro/bicarbonato. A medida que el papel del CFTR se ha vuelto más complejo, se ha vuelto difícil establecer con precisión cómo un defecto en esta proteína conduce al desarrollo de infecciones pulmonares crónicas. Si bien existe un debate considerable, muchos investigadores estarían de acuerdo con las siguientes declaraciones.

Debido a que el movimiento de agua de las células epiteliales por ósmosis sigue el movimiento de las sales, las anomalías en el flujo de $Cl^-$, $HCO_3^-$ y/o $Na^+$ causadas por la deficiencia de CFTR conducen a una disminución en el fluido que baña las células epiteliales de las vías respiratorias (consúltese figura 1). Una reducción en el volumen del líquido superficial, y el aumento resultante en la viscosidad del moco secretado, afecta la función de los cilios que empujan el moco y las bacterias fuera del tracto respiratorio. A muchos pacientes con CF les ayuda inhalar un aerosol de solución salina hipertónica, que ayuda a atraer más agua hacia las vías respiratorias y reducir la viscosidad del moco. También se están llevando a cabo ensayos clínicos con compuestos que tienen el potencial de aumentar el volumen del fluido superficial, al alterar los movimientos de los iones dentro y fuera de las células epiteliales (consúltese figura 1). Uno de estos compuestos es el inhibidor del canal de $Na^+$ EnaC denominado GS-9411, que se esperaba ayudaría a tratar la CF al reducir la absorción de iones $Na^+$ del fluido de las vías respiratorias hacia el epitelio. Desafortunadamente, este fármaco causó niveles elevados de potasio en la sangre y los ensayos clínicos tuvieron que finalizar, lo que ilustra los desafíos de tratar una enfermedad con enfoque en canales iónicos con amplias funciones en la fisiología. De aquí que se esperó que una mejor comprensión de la genética de la CF pudiera conducir al desarrollo de fármacos dirigidos con mayor precisión, que pudieran tratar la CF sin causar alteraciones de gran alcance en la química corporal.

En la última década, los investigadores identificaron más de 1 000 mutaciones diferentes que dan lugar a la fibrosis quística. Sin embargo, aproximadamente 70% de los alelos responsables de la fibrosis quística en Estados Unidos contienen la misma alteración genética (designada ΔF508); faltan tres pares de bases de DNA que codifican una fenilalanina en la posición 508, dentro de uno de los dominios citoplásmicos del polipéptido CFTR. Posteriores investigaciones han revelado que los polipéptidos

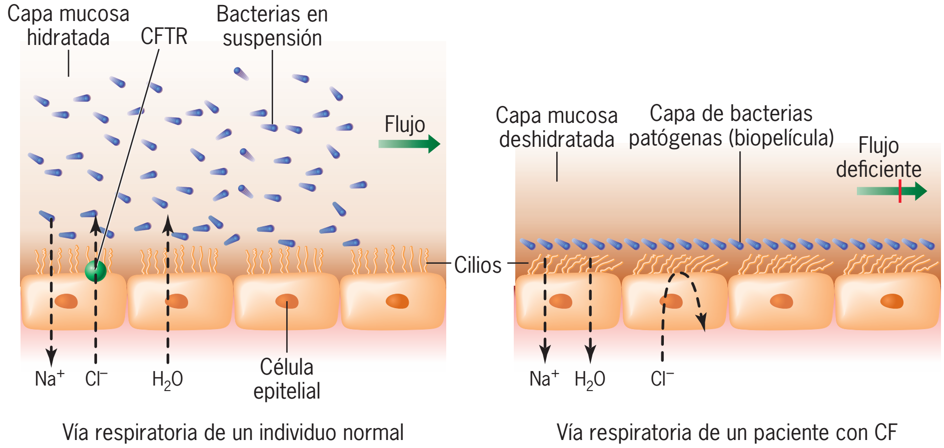



**FIGURA 1 Una explicación de los efectos debilitantes en la función pulmonar a partir de la ausencia de la proteína CFTR.** En el epitelio de la vía aérea de un individuo normal, el agua sale de las células epiteliales en respuesta al movimiento hacia afuera de los iones, lo que hidrata la capa mucosa de la superficie. La capa mucosa hidratada, con su bacteria atrapada, se mueve fácilmente fuera de las vías respiratorias. En el epitelio de las vías respiratorias de una persona con fibrosis quística el movimiento anormal de los iones hace que el agua fluya en la dirección opuesta, lo cual deshidrata la capa mucosa. Como resultado, las bacterias atrapadas no se pueden mover fuera de las vías respiratorias, lo que les permite proliferar como una biopelícula (página 13) y causar infecciones crónicas.

**TABLA 1**

| Trastorno hereditario | Tipo de canal | Gen | Consecuencias clínicas |
|---|---|---|---|
| Migraña hemipléjica familiar (FHM, *familial hemiplegic migraine*) | $Ca^{2+}$ | *CACNL1A4* | Cefalea migrañosa |
| Ataxia episódica tipo 2 (EA-2, *episodic ataxia type 2*) | $Ca^{2+}$ | *CACNL1A4* | Ataxia (falta de equilibrio y coordinación) |
| Parálisis periódica hipocalcémica | $Ca^{2+}$ | *CACNL1A3* | Miotonía periódica (rigidez muscular) y parálisis |
| Ataxia episódica tipo-1 | $K^{+}$ | *KCNA1* | Ataxia |
| Convulsiones neonatales familiares benignas | $K^{+}$ | *KCNQ2* | Convulsiones epilépticas |
| Sordera dominante no sindrómica | $K^{+}$ | *KCNQ4* | Sordera |
| Síndrome de QT largo | $K^{+}$<br>$Na^{+}$ | *HERG*<br>*KCNQ1, o SCN5A* | Vértigo, muerte súbita por fibrilación ventricular |
| Parálisis periódica hipercalcémica | $Na^{+}$ | *SCN4A* | Miotonía periódica y parálisis |
| Síndrome de Liddle | $Na^{+}$ | *B ENaC* | Hipertensión (presión arterial alta) |
| Miastenia gravis | $Na^{+}$ | *nAChR* | Debilidad muscular |
| Enfermedad de Dent | $Cl^{-}$ | *CLCN5* | Cálculos renales |
| Miotonía congénita | $Cl^{-}$ | *CLC 1* | Miotonía periódica |
| Síndrome de Bartter tipo IV | $Cl^{-}$ | *CLC Kb* | Disfunción renal, sordera |
| Fibrosis quística | $Cl^{-}$ | *CFTR* | Congestión pulmonar e infecciones |
| Arritmias cardiacas | $Na^{+}$<br>$K^{+}$<br>$Ca^{2+}$ | Muchos genes diferentes | Latidos cardiacos irregulares o rápidos |

Véase *Nature Cell Biol* 2004;6:1040, o *Nature* 2006;440:444, para una lista más completa.

CFTR que carecen de este aminoácido particular no se procesan normalmente dentro de las membranas del retículo endoplásmico, y de hecho nunca llegan a la superficie de las células epiteliales. Como resultado, los pacientes con CF que son homocigotos para el alelo ΔF508 carecen completamente del canal de CFTR en sus membranas plasmáticas y tienen una forma grave de la enfermedad. Cuando las células de estos pacientes crecen en cultivos a temperatura más baja, la proteína mutante se transporta a la membrana plasmática donde funciona bastante bien. Este hallazgo ha llevado a varias compañías farmacéuticas a buscar pequeñas moléculas que se puedan unir a estas moléculas mutantes de CFTR, que eviten su destrucción en el citoplasma y les permitan alcanzar la superficie de la célula. Uno de estos fármacos candidatos, el VX-809, fracasó en mostrar mejoras en los pacientes en el resultado de los ensayos clínicos. Otro medicamento llamado Kalydeco (también conocido como Ivacaftor) se une al CFTR y mantiene el canal de iones abierto. Este fármaco está clínicamente aprobado para el tratamiento de la CF en pacientes que portan la sustitución de aminoácidos G551D, que no impide que el CFTR llegue a la superficie, sino que reduce la capacidad de apertura del canal. El Kalydeco supera este defecto. Desafortunadamente, solo 4% de los pacientes con CF tienen la mutación G551D. No obstante, los ensayos clínicos sugieren que el Kalydeco en combinación con el VX-809 se puede usar para tratar pacientes con el alelo ΔF508, posiblemente porque ayuda a que los canales que alcanzan la superficie permanezcan abiertos por más tiempo.

Según una estimación, la mutación ΔF508 tuvo que haberse originado hace más de 50 000 años para haber alcanzado una frecuencia tan alta en la población. El hecho de que el gen de la CF haya alcanzado esta frecuencia sugiere que los heterocigotos pueden recibir alguna ventaja selectiva sobre aquellos que carecen de una copia del gen defectuoso. Se ha propuesto que los heterocigotos CF pueden estar protegidos de los efectos del cólera. Una dificultad con esta propuesta es que no hay registro de epidemias de cólera en Europa hasta la década de 1820. Una propuesta alternativa sugiere que los heterocigotos están protegidos de la fiebre tifoidea, porque la bacteria responsable de esta enfermedad se adhiere mal a la pared de un intestino que tiene un número reducido de moléculas de CFTR.

Desde que se aisló el gen responsable de la CF el desarrollo de una cura mediante terapia génica —o sea, mediante el reemplazo del gen defectuoso por una versión normal— ha sido un objetivo principal de los investigadores de la CF. La fibrosis quística es un buen candidato para la terapia génica porque los peores síntomas de la enfermedad son consecuencia de las actividades defectuosas de las células epiteliales que recubren las vías respiratorias, y por tanto son accesibles a los agentes que pueden administrarse por inhalación de un aerosol. Los ensayos clínicos se han llevado a cabo usando varios tipos diferentes de sistemas de administración. En un grupo de ensayos, el gen *CFTR* normal se incorporó en el DNA de un adenovirus defectuoso, un tipo de virus que normalmente causa infecciones del tracto respiratorio superior. A continuación, se permitió que las partículas del virus de recombinación infectaran las células de las vías respiratorias, con la administración del gen normal a las células deficientes genéticamente. La principal desventaja en el uso de adenovirus es que el DNA viral (junto con el gen CFTR normal) no se integra en los cromosomas de la célula hospedadora infectada, por lo que el virus debe readministrarse con frecuencia. Como resultado el procedimiento a menudo induce una respuesta inmune dentro del paciente, que elimina el virus y conduce a la inflamación pulmonar. Los investigadores dudan en emplear virus que integren sus genomas por temor a iniciar la formación de cáncer. En otros ensayos, el DNA que codifica el gen *CFTR* normal se ha relacionado con liposomas cargados positivamente (página 121), que se pueden fusionar con las membranas plasmáticas de las células de las vías respiratorias y entregando sus contenidos de DNA en el citoplasma. La administración basada en lípidos tiene una ventaja sobre los virus: es menos propensa a estimular una respuesta inmune destructiva después de tratamientos repetidos; pero tiene la desventaja de ser menos eficaz para lograr la modificación genética de las células objetivo. Hasta la fecha, ninguno de los ensayos clínicos de terapia génica ha resultado en una mejora significativa de los procesos fisiológicos o los síntomas de la enfermedad. Si se quiere lograr un tratamiento para la CF con base en la terapia génica, será necesario desarrollar sistemas más efectivos de administración de DNA, capaces de alterar genéticamente un mayor porcentaje de las células de las vías respiratorias.

# 4.16 Potenciales de membrana

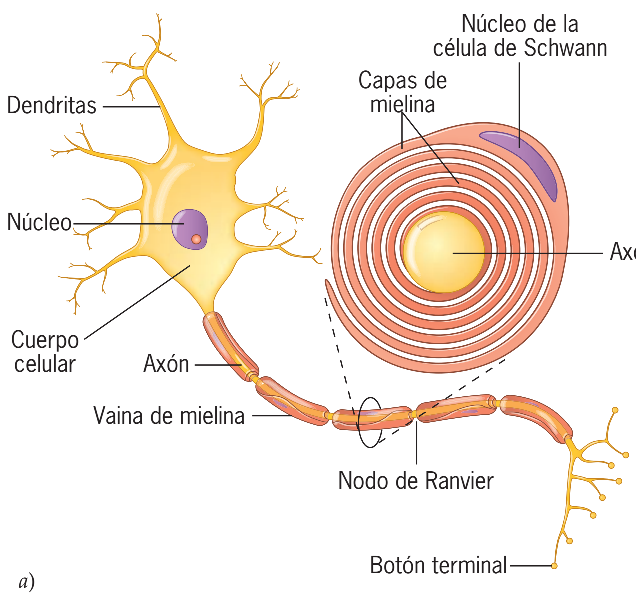
Todos los organismos responden a la estimulación externa, una propiedad denominada *irritabilidad*. Incluso una ameba unicelular, si se pincha con una aguja de vidrio fino, responde retirando sus pseudópodos, se recoge y se mueve en otra dirección. La irritabilidad en una ameba depende de las mismas propiedades básicas de las membranas que conducen a la formación y propagación de los impulsos nerviosos, que es el tema del resto del capítulo.

Las *células nerviosas* (o *neuronas*) están especializadas en la recolección, producción y transmisión de información, que se codifica en forma de impulsos eléctricos de rápido movimiento. Las partes básicas de una neurona típica se ilustran en la **FIGURA 4-51*a***). El núcleo de la neurona se encuentra dentro de una región expandida llamada *cuerpo celular*, centro metabólico de la célula y el lugar donde se fabrican la mayoría de sus contenidos materiales. Extendiéndose desde los cuerpos celulares de la mayoría de las neuronas hay varias extensiones finas, llamadas **dendritas**, que reciben información *entrante* de fuentes externas, usualmente de otras neuronas. También emerge del cuerpo de la célula una extensión única y más prominente, el **axón**, que conduce los impulsos *salientes* lejos del cuerpo de la célula y hacia la(s) célula(s) objetivo. Aunque algunos axones pueden tener solo unos pocos micrómetros de longitud, otros se extienden a distancias mucho más largas (véase figura 4-51*b*); en el cuerpo de un gran vertebrado como una jirafa, o una ballena, los axones pueden medir muchos metros. La mayoría de los axones se dividen cerca de sus extremos en prolongaciones más pequeñas, cada una de las cuales termina en un *botón terminal*, un sitio especial donde los impulsos se transmiten de la neurona a la célula objetivo. Muchas neuronas en el cerebro terminan en miles de botones terminales, que permiten que estas células cerebrales se comuniquen con miles de objetivos potenciales. Como se discutió en la página 118, la mayoría de las neuronas en el cuerpo de los vertebrados están envueltas en una **vaina de mielina** rica en lípidos, cuya función se describe a continuación.

## El potencial de reposo

Se produce un voltaje (o diferencia de potencial eléctrico) entre dos puntos —como en el interior y el exterior de la membrana plasmática— cuando hay un exceso de iones positivos en un punto y un exceso de iones negativos en el otro. Los voltajes a través de las membranas plasmáticas se pueden medir al insertar un electrodo de vidrio fino (o *microelectrodo*) en el citoplasma de una célula, otro electrodo en el fluido extracelular fuera de la célula y la conexión de los electrodos a un voltímetro, un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos puntos (obsérvese **FIGURA 4-52**). Cuando este experimento se realizó por primera vez en un axón gigante de calamar, se registró una diferencia de potencial de aproximadamente 70 milivoltios (mV), siendo el interior negativo con respecto al lado externo (indicado con un signo menos, –70 mV). La presencia de un **potencial de membrana** no es exclusiva de las células nerviosas; tales potenciales están presentes en todos los tipos de células, la magnitud varía entre aproximadamente –15 y –100 mV. Cuando una célula nerviosa o muscular se encuentra en un estado no excitado, el potencial de la membrana se denomina **potencial de reposo** porque está sujeto a cambios espectaculares, como se analiza en la siguiente sección.

La magnitud y dirección del voltaje a través de la membrana plasmática están determinadas por las diferencias en las concentraciones de iones en cada lado de la membrana y sus permeabilidades relativas. Como se describió anteriormente en este capítulo, la $Na^+/K^+$-ATPasa bombea el $Na^+$ fuera de la célula y el $K^+$ hacia la célula, lo que establece gradientes pronunciados de estos dos iones a través de la membrana plasmática. A causa de estos gradientes, es de esperar que los iones de potasio se escapen de la célula y que los iones de sodio se filtren hacia dentro a través de sus canales iónicos respectivos. Sin embargo, la gran mayoría de los canales iónicos en la membrana plasmática de una célula nerviosa *en reposo* están cerrados. Aquellos que están abiertos son selectivos para el $K^+$; a menudo se los conoce como *canales de fugas de* $K^+$. Los canales de fuga de $K^+$ son miembros de la familia K2P de canales $K^+$, que carecen del detector de voltaje S4 (página 145) y no responden a los cambios de voltaje.



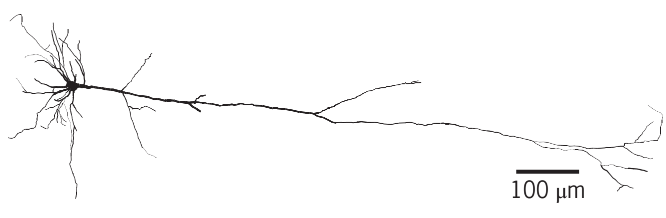




**FIGURA 4-51 La estructura de una célula nerviosa.** *a*) Esquema de una neurona simple con un axón mielinizado. Como muestra la figura, la vaina de mielina comprende células individuales de Schwann que se han envuelto alrededor del axón. Los sitios donde el axón carece de envoltura de mielina se llaman nodos de Ranvier. (*Nota:* Las células formadoras de mielina dentro del sistema nervioso central se llaman oligodendrocitos en lugar de células de Schwann); *b*) Micrografía compuesta de una sola neurona hipocampal de rata con cuerpo celular y dendritas (púrpura) y un axón de 1 cm de longitud (rojo). Las células nerviosas motoras en los mamíferos mayores pueden ser de 100 veces esta longitud.

FUENTE: *b*) De Carlos F. Ibáñez. *Trends Cell Biol* 2007;17:520, © 2007, con permiso de Elsevier.

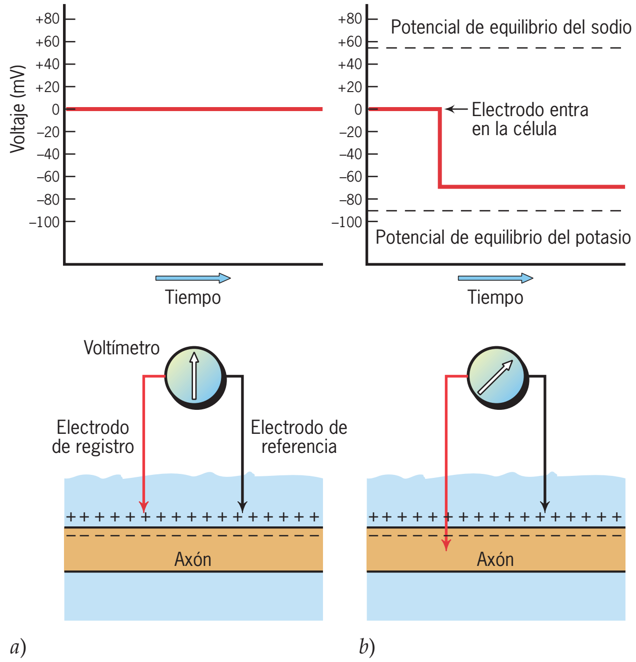



**FIGURA 4-52 Medición del potencial de reposo de una membrana.** Se mide un potencial cuando se detecta una diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el de registro. En *a*) ambos electrodos están en el exterior de la célula, y no se mide diferencia de potencial (voltaje). Cuando un electrodo penetra en la membrana plasmática del axón en *b*), el potencial cae inmediatamente a –70 mV (el interior es negativo), que se acerca al potencial de equilibrio de los iones de potasio, es decir, el potencial que se produciría si la membrana fuera impermeable a todos los iones excepto al potasio.

Debido a que los iones $K^+$ son la única especie cargada con una permeabilidad significativa en una célula nerviosa en reposo, su salida a través de la membrana deja un exceso de cargas negativas en el lado citoplásmico de la membrana. Aunque el gradiente de concentración a través de la membrana favorece la salida continua del $K^+$, el gradiente eléctrico resultante del exceso de carga negativa en el interior de la membrana favorece la retención de los iones $K^+$ dentro de la célula. Cuando estas dos fuerzas opuestas están equilibradas, se alcanza el equilibrio y no hay más movimiento *neto* de iones $K^+$ a través de la membrana. Mediante la siguiente ecuación —la ecuación de Nernst— se puede calcular el potencial de membrana ($V_m$) que se mediría en el equilibrio si la membrana plasmática de una célula nerviosa fuera permeable solo a los iones de $K^+$.[7] En este caso $V_m$ sería igual al potencial de equilibrio del potasio ($E_K$):

$$E_K = 2.303\ \frac{\mathrm{RF}}{zF} \cdot \log_{10} \frac{[\mathrm{K_o^+}]}{[\mathrm{K_i^+}]}$$

Para el axón gigante de calamar, la $[K_i^+]$ interna es de aproximadamente 350 mM, mientras que la $[K_o^+]$ externa es de aproximadamente 10 mM; así a 25 °C (298 K) y $z = +1$ (para el univalente ion $K^+$),

$$E_K = 59 \log_{10} 0.028 = -91 \text{ mV}$$

Un cálculo similar del potencial de equilibrio del $Na^+$ ($E_{Na}$) produciría un valor de aproximadamente +55 mV. Como las mediciones del voltaje a través de la membrana nerviosa en reposo son similares en signo y magnitud (–70 mV) al potencial de equilibrio del potasio recién calculado, el movimiento de iones de potasio a través de la membrana se considera el factor más importante para determinar el potencial de reposo. La diferencia entre el potencial de equilibrio $K^+$ calculado (–91 mV) y el potencial de reposo medido (–70 mV, véase figura 4-52) se debe a una ligera permeabilidad de la membrana al $Na^+$, a través de un canal de fuga del $Na^+$ descrito recientemente.

[7] La ecuación de Nernst se deduce de la ecuación que aparece en la página 140, al establecer $\Delta G = 0$, que es el caso cuando el movimiento de los iones está en equilibrio.

## El potencial de acción

Nuestra comprensión actual de los potenciales de membrana y los impulsos nerviosos descansa en un conjunto de investigaciones llevadas a cabo en los axones gigantes del calamar a finales de la década de 1940 y principios de la de 1950 por un grupo de fisiólogos británicos, más notablemente por Alan Hodgkin, Andrew Huxley y Bernard Katz. Esos axones, que tienen aproximadamente 1 mm de diámetro, transportan impulsos a altas velocidades, lo que permite que el calamar escape rápidamente de los depredadores. También facilitó la medición de su actividad eléctrica el gran tamaño de estos axones cuando se comparan con los axones microscópicos de las neuronas de mamíferos. Si la membrana de un axón de calamar en reposo es estimulada al golpearla con una aguja fina, o sacudiéndola con una corriente eléctrica muy pequeña, algunos de sus canales de sodio se abren, lo que permite que un número limitado de iones de sodio se difunda dentro de la célula. Esta oportunidad para que los iones cargados positivamente se muevan hacia la célula reduce el potencial de membrana, lo que la hace menos negativa. Como el cambio positivo en el voltaje de la membrana provoca una *disminución* de la polaridad entre los dos lados de la membrana, se le llama **despolarización**.

Si el estímulo hace que la membrana se despolarice solo unos pocos milivoltios, digamos desde –70 a –60 mV, la membrana vuelve rápidamente a su potencial de reposo tan pronto como el estímulo cesa (consúltese **FIGURA 4-53*a***), recuadro de la izquierda). Sin embargo, si el estímulo despolariza la membrana más allá de cierto punto, llamado **umbral**, que ocurre a unos –50 mV, se inicia una nueva serie de eventos. El cambio en el voltaje hace que se abran los canales de sodio regulados por voltaje. Como resultado los iones de sodio se difunden libremente hacia abajo dentro de la célula [consúltese figura 4-53*a*), recuadro central] tanto en su concentración como en su gradiente eléctrico. La mayor permeabilidad de la membrana a los iones $Na^+$, y el movimiento correspondiente de carga positiva en la célula, hace que la membrana revierta el potencial brevemente (véase figura 4-53*b*), se vuelve positivo hasta aproximadamente +40 mV, lo que se aproxima el potencial de equilibrio del $Na^+$ (véase figura 4-52).

Después de 1 ms aproximadamente, los canales de sodio se inactivan espontáneamente y bloquean la afluencia adicional de iones $Na^+$. Según la opinión predominante, la inactivación resulta de la difusión aleatoria de un péptido de inactivación en la abertura del poro del canal, de una manera similar a la descrita para los canales de $K^+$ en la página 147. Mientras tanto, el cambio en el potencial de membrana causado por la afluencia de $Na^+$ desencadena la apertura de los canales de potasio dependientes de voltaje [consúltese figura 4-53*a*), recuadro de la derecha], que se trata en la página 145. Como resultado, los iones de potasio se difunden libremente fuera de la célula por su empinado gradiente de concentración. La disminución de la permeabilidad de la membrana al $Na^+$ y el aumento de la permeabilidad al $K^+$ hacen que el potencial de la membrana oscile nuevamente a un valor negativo de aproximadamente –80 mV, acercándose al potencial de equilibrio del $K^+$ (obsérvese figura 4-52). Este gran potencial negativo de membrana provoca el cierre de los canales de potasio dependientes de voltaje (véase figura 4-43*b*), lo que devuelve la membrana a su estado de reposo. En conjunto, estos cambios en el potencial de membrana se llaman un **potencial de acción** (véase figura 4-53*b*). La serie completa de cambios durante un potencial de acción lleva solo alrededor de 5 mseg en el axón de calamar, y menos de 1 ms en una célula nerviosa de mamífero

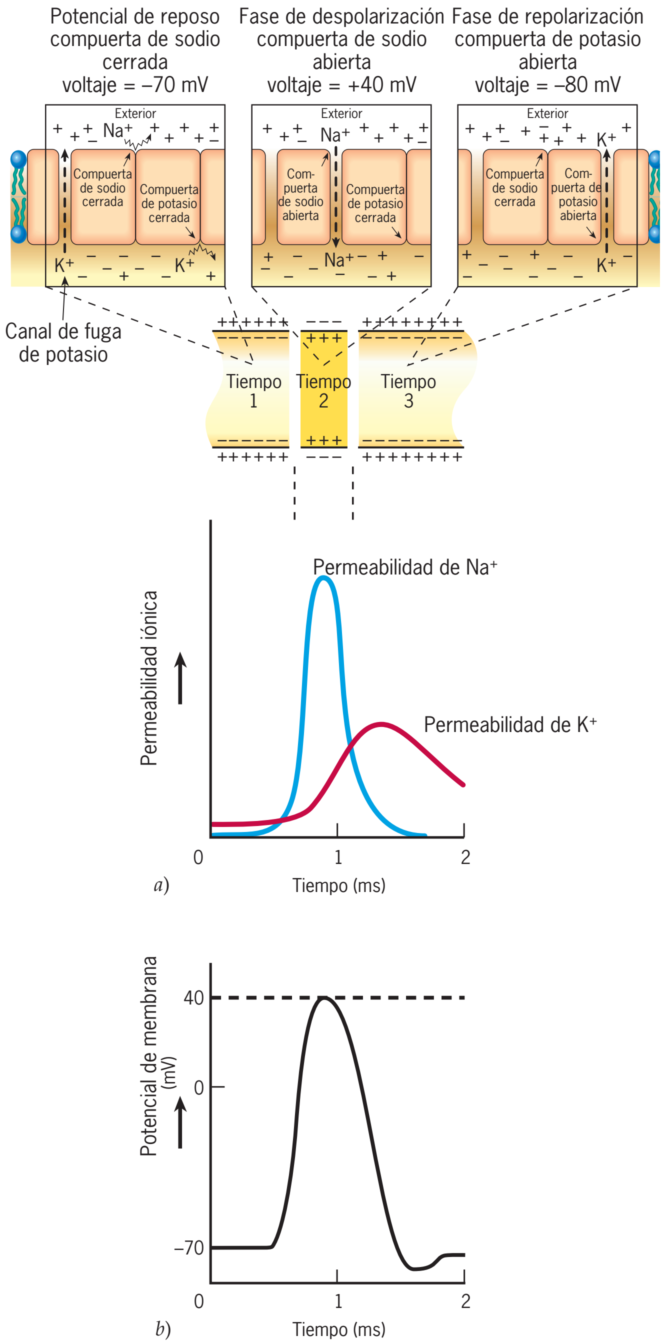



**FIGURA 4-53 Formación de un potencial de acción.** *a*) Tiempo 1, recuadro superior izquierdo: la membrana en esta región de la célula nerviosa muestra el potencial de reposo, en el que solo los canales de fuga de $K^+$ están abiertos y el voltaje de la membrana es de aproximadamente –70 mV. Tiempo 2, recuadro central superior, muestra la fase de despolarización: la membrana se ha despolarizado más allá del valor umbral abriendo las compuertas de sodio reguladas por voltaje, lo que provoca una afluencia de iones $Na^+$ (indicado en el cambio de permeabilidad en el gráfico inferior). El aumento de la permeabilidad del $Na^+$ hace que el voltaje de la membrana se invierta temporalmente y alcance un valor de aproximadamente +40 mV en el axón gigante del calamar (tiempo 2). Es esta inversión del potencial de membrana lo que constituye el potencial de acción. Tiempo 3, recuadro superior derecho, muestra la fase de repolarización: en una pequeña fracción de segundo, las compuertas de sodio se inactivan y las compuertas de potasio se abren, lo que permite que los iones de potasio se difundan por la membrana (parte inferior del dibujo) y establezcan un potencial más negativo en esa ubicación (–80 mV) que el potencial de reposo. Casi tan pronto como se abren, las compuertas de potasio se cierran y dejan los canales de fuga de potasio como la ruta primaria de movimiento de iones a través de la membrana, y se restablece el potencial de reposo. *b*) Un resumen de los cambios de voltaje que ocurren durante un potencial de acción, como se describe en la parte *a*).

mielinizada. Tras un potencial de acción, la membrana entra en un breve *periodo refractario* durante el cual no puede ser reestimulada. El periodo refractario ocurre porque los canales de sodio, que se inactivaron durante la etapa inicial del potencial de acción, se deben cerrar antes de que puedan reabrirse en respuesta a otro estímulo. Como se muestra en la figura 4-43, la transformación del canal iónico de la conformación inactivada a la cerrada solo puede ocurrir después de que el péptido inactivador haya salido de la abertura del poro.

Aunque el potencial de acción cambia drásticamente el voltaje de la membrana, solo un pequeño porcentaje de los iones en ambos lados de la membrana están involucrados en cualquier potencial de acción. Los sorprendentes cambios en el potencial de membrana que se ven en la figura 4-53*b*) no son causados por cambios en las *concentraciones* de iones $Na^+$ y $K^+$ en los dos lados de la membrana (tales cambios son insignificantes). Más bien los provocan los movimientos de las cargas, en una dirección u otra, que resultan de los cambios fugaces en la permeabilidad en estos iones. Aquellos iones $Na^+$ y $K^+$ que sí cambian de lugar a través de la membrana durante un potencial de acción son eventualmente bombeados de regreso por la $Na^+/K^+$-ATPasa. Incluso si esta se inhibe, una neurona a menudo puede continuar emitiendo miles de impulsos antes de que se disipen los gradientes iónicos establecidos por la actividad de la bomba.

Una vez que la membrana de una neurona se despolariza al valor umbral, se dispara un potencial de acción en su forma más completa, sin más estimulación. Esta característica de la función de las células nerviosas se conoce como la *ley del todo o nada*. No hay término medio; la despolarización subumbral es incapaz de desencadenar un potencial de acción mientras que la despolarización umbral provoca automáticamente una respuesta máxima. La energía necesaria para crear un potencial de acción se almacena con anticipación mediante la $Na^+/K^+$-ATPasa, que genera gradientes iónicos pronunciados a través de la membrana plasmática. Una vez que se logra esto, los diversos iones están listos para fluir a través de la membrana hacia abajo de sus respectivos gradientes electroquímicos tan pronto como se abran sus canales iónicos, al igual que el agua que fluye de una presa una vez que se liberan las compuertas.

Los movimientos de los iones a través de la membrana plasmática de las células nerviosas forman la base de la comunicación neuronal. Ciertos anestésicos *locales*, como la procaína y la novocaína, actúan por cierre de los canales iónicos en las membranas de las células sensoriales y las neuronas. Mientras estos canales iónicos permanezcan cerrados las células afectadas no pueden generar potenciales de acción, y por tanto no pueden informar al cerebro de los eventos que ocurren en la piel o los dientes.

**REPASO**

1. ¿Qué es un potencial de reposo? ¿Cómo se establece como resultado del flujo de iones?
2. ¿Qué es un potencial de acción? ¿Cuáles son los pasos que conducen a sus diversas fases?

## 4.17 Propagación de los potenciales de acción como impulso

Hasta este punto la discusión se ha restringido a eventos que ocurren en un sitio particular en la membrana de la célula nerviosa, donde la despolarización experimental ha desencadenado un potencial de acción. Una vez que se ha iniciado un potencial de acción, no permanece localizado en un sitio en particular, sino que se *propaga* como **impulso nervioso** a lo largo de la célula hasta las terminaciones nerviosas.

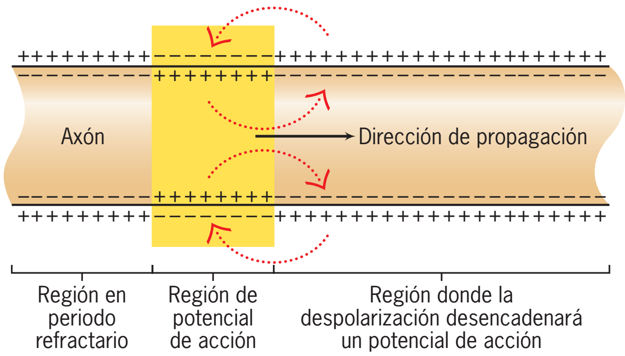



**FIGURA 4-54 La propagación de un impulso resulta del flujo local de iones.** Un potencial de acción en un sitio en la membrana despolariza una región adyacente a esta y desencadena un potencial de acción en el segundo sitio. El potencial de acción solo puede fluir hacia adelante, porque la porción de la membrana que acaba de experimentar un potencial de acción permanece en un periodo refractario.

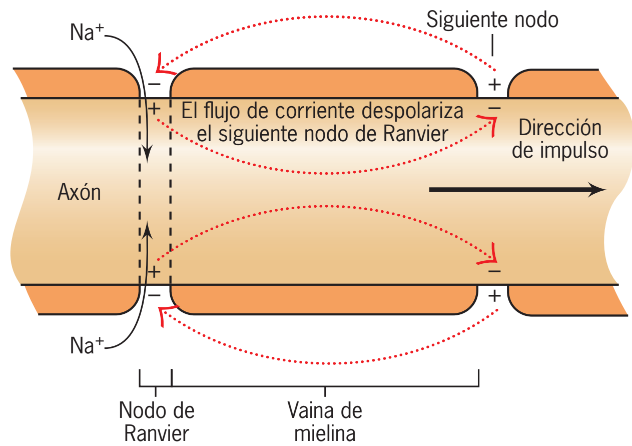



**FIGURA 4-55 Conducción saltatoria.** Durante la conducción saltatoria, solo la membrana en la región nodal del axón se despolariza y es capaz de generar un potencial de acción. Esto se logra mientras la corriente fluye directamente desde un nodo activado al siguiente nodo inactivo a lo largo del axón.

Los impulsos nerviosos se propagan a lo largo de una membrana porque un potencial de acción en un sitio tiene un efecto en el sitio adyacente. La gran despolarización que acompaña a un potencial de acción crea una diferencia de carga a lo largo de las superficies interna y externa de la membrana plasmática (obsérvese **FIGURA 4-54**). Como resultado, los iones positivos se mueven hacia el área de despolarización en la superficie externa de la membrana, y lejos de ese sitio en la superficie interna (véase figura 4-54). Este flujo local de corriente hace que la membrana se despolarice justo en la región por delante del potencial de acción. Debido a que la despolarización que acompaña al potencial de acción es muy grande, la membrana en la región adyacente se despolariza fácilmente en un nivel mayor que el valor umbral, lo que abre los canales de sodio en esta región adyacente y genera otro potencial de acción. De aquí que una vez que se activa, una sucesión de potenciales de acción pasa a lo largo de toda la neurona sin ninguna pérdida de intensidad, para llegar a su célula objetivo con la misma fortaleza que tenía en su punto de origen.

Puesto que todos los impulsos que viajan a lo largo de una neurona exhiben la misma fortaleza, los estímulos más fuertes no pueden producir impulsos "más grandes" que los estímulos más débiles. Sin embargo, somos claramente capaces de detectar diferencias en la fortaleza de un estímulo. La habilidad de hacer discriminaciones sensoriales depende de varios factores. Por ejemplo, un estímulo fuerte —como el agua hirviendo— activa más células nerviosas que un estímulo débil como el agua tibia. También activa las neuronas de "alto umbral" que permanecerían en reposo si el estímulo fuera más débil. La fortaleza del estímulo también está codificada en el patrón y la frecuencia mediante los que los potenciales de acción se lanzan hacia una neurona en particular. En la mayoría de los casos, cuanto más fuerte es el estímulo, mayor es el número de impulsos generados.

Cuanto mayor es el diámetro de un axón, menor es la resistencia al flujo local de corriente, y más rápidamente un potencial de acción en un sitio puede activar las regiones adyacentes de la membrana. Algunos invertebrados, como el calamar y las lombrices tubulares, han desarrollado axones gigantes que facilitan que el animal escape del peligro. Sin embargo, hay un límite en este enfoque evolutivo. Como la velocidad de conducción aumenta con la raíz cuadrada del aumento del diámetro, un axón de 480 μm de diámetro puede conducir un potencial de acción solo cuatro veces más rápido que uno de 30 μm de diámetro.

Durante la evolución de los vertebrados, se logró un aumento en la velocidad de conducción cuando el axón se cubrió con una envoltura de mielina (véanse figuras 4-5 y 4-51). Debido a que está compuesta por muchas capas de membranas que contienen lípidos, la vaina de mielina es ideal para prevenir el paso de iones a través de la membrana plasmática. Además, casi todos los canales iónicos de $Na^+$ de una neurona mielinizada residen en los espacios no envueltos, o *nodos de Ranvier*, entre las células de Schwann adyacentes u oligodendrocitos que forman la cubierta (véase figura 4-51). En consecuencia, los nodos de Ranvier son los únicos sitios donde se pueden generar potenciales de acción. Un potencial de acción en un nodo desencadena un potencial de acción en el siguiente nodo (consúltese **FIGURA 4-55**), lo cual provoca que el impulso salte de un nodo a otro sin tener que activar la membrana intermedia. La propagación de un impulso por este mecanismo se llama **conducción saltatoria**. Los impulsos se conducen a lo largo de un axón mielinizado a velocidades de hasta 120 metros por segundo, más de 20 veces mayor que la velocidad en que viajan los impulsos en una neurona no mielinizada del mismo diámetro.

La esclerosis múltiple (ES, *multiple sclerosis*), una enfermedad asociada con el deterioro de la vaina de mielina que rodea a los axones en varias partes del sistema nervioso ilustra de manera impresionante la importancia de la mielinización. Las manifestaciones de la enfermedad por lo general comienzan en la edad adulta; los pacientes experimentan debilidad en sus manos, dificultad para caminar y problemas con su visión.

**REPASO**

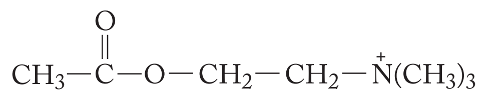
1. ¿Cómo se propaga un potencial de acción a lo largo de un axón? ¿Qué es la conducción saltatoria, y cómo ocurre tal proceso?
2. ¿Cuál es el papel de la vaina de mielina en la conducción de un impulso?

## 4.18 Neurotransmisión: el salto de la hendidura sináptica

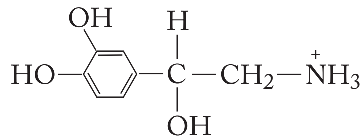
Las neuronas se vinculan con sus células objetivo en las uniones especializadas llamadas **sinapsis**. El examen cuidadoso de una sinapsis revela que las dos células no hacen contacto directo, sino

que están separadas entre sí por un espacio angosto de aproximadamente 20 a 50 nm. Este espacio se llama **hendidura sináptica**. Una **célula presináptica** (una célula receptora o una neurona) conduce impulsos hacia una sinapsis, y una **célula postsináptica** (una neurona, músculo o glándula) se encuentra siempre en el lado receptor de una sinapsis. La **FIGURA 4-56** muestra una serie de sinapsis entre las ramas terminales de un axón y una célula del músculo esquelético; las sinapsis de este tipo se llaman **uniones neuromusculares**.

¿Cómo un impulso en una neurona presináptica salta a través de la hendidura sináptica y afecta la célula postsináptica? Estudios realizados hace décadas indicaron que una sustancia química está involucrada en la transmisión de un impulso de una célula a otra (página 148). En el microscopio electrónico, las mismas puntas (botones terminales) de las ramas de un axón parecen contener grandes cantidades de **vesículas sinápticas** (véase figura 4-56, recuadro izquierdo), que sirven como sitios de almacenamiento para los transmisores químicos que actúan sobre las células postsinápticas. Dos de los **neurotransmisores** mejor estudiados son la acetilcolina y la noradrenalina que transmiten impulsos a los músculos esqueléticos y cardiacos del cuerpo.



Acetilcolina (ACh)



Noradrenalina

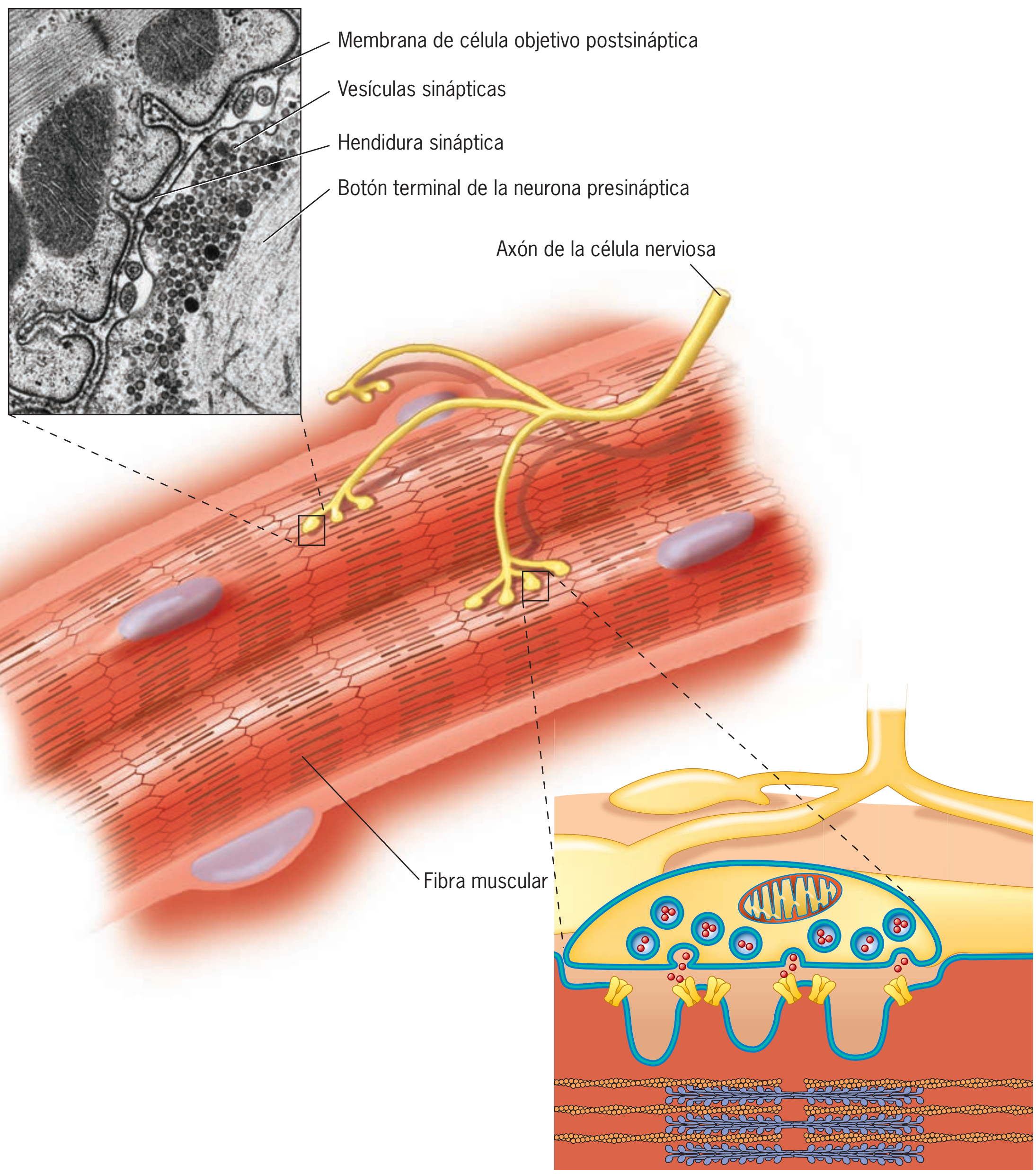



**FIGURA 4-56 La unión neuromuscular es el sitio donde las ramas de un axón motor forma sinapsis con las fibras musculares de un músculo esquelético.** El recuadro izquierdo muestra las vesículas sinápticas que residen dentro del botón terminal del axón, y la estrecha hendidura sináptica entre el botón terminal y la célula objetivo postsináptica. El recuadro derecho muestra el botón terminal presionado estrechamente contra la membrana plasmática de la célula muscular. Las moléculas de los neurotransmisores (rojo) liberadas por las vesículas sinápticas de la neurona presináptica se unen a los receptores (amarillo) en la superficie de la célula muscular (azul).

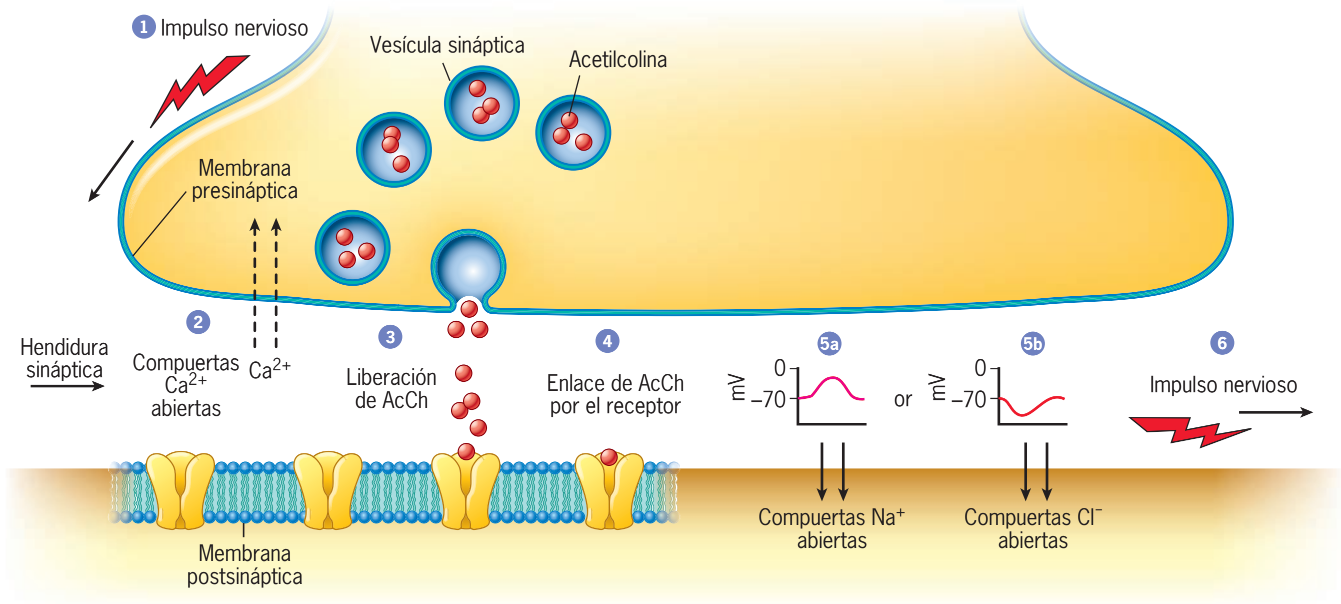



**FIGURA 4-57 Secuencia de eventos durante la transmisión sináptica con la acetilcolina como neurotransmisor.** Durante los pasos 1-4 un impulso nervioso alcanza el botón terminal del axón, las compuertas de calcio se abren lo que conduce a una afluencia de $Ca^{2+}$, y la acetilcolina se libera de las vesículas sinápticas y se une a los receptores en la membrana postsináptica. Si la unión de las moléculas del neurotransmisor causa una despolarización de la membrana postsináptica (como en 5a), allí se puede generar un impulso nervioso (6). Sin embargo, si la unión del neurotransmisor causa una hiperpolarización de la membrana postsináptica (5b) la célula objetivo se inhibe, lo cual hace más difícil que se genere un impulso en la célula objetivo mediante otra estimulación excitatoria. La descomposición del neurotransmisor por la acetilcolinesterasa no se muestra.

La secuencia de eventos durante la transmisión sináptica se puede resumir de la siguiente manera (véase **FIGURA 4-57**). Cuando un impulso llega a un botón terminal (paso 1, consúltese **FIGURA 4-57**), la despolarización acompañante induce la apertura de varios canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje en la membrana plasmática de esta parte de la célula nerviosa presináptica (paso 2, véase figura 4-57). Los iones de calcio por lo general están presentes a muy baja concentración dentro de la neurona, como en todas las células (alrededor de 100 nM). Cuando las compuertas se abren, los iones de calcio se difunden desde el fluido extracelular al botón terminal de la neurona, lo que provoca que la $[Ca^{2+}]$ se eleve más de mil veces en los microdominios localizados cerca de los canales. La $[Ca^{2+}]$ elevada desencadena la fusión rápida de una —o unas pocas— vesículas sinápticas cercanas con la membrana plasmática y conlleva a la liberación de moléculas de neurotransmisores en la hendidura sináptica (paso 3, véase figura 4-57).

Una vez liberadas de las vesículas sinápticas, las moléculas de neurotransmisores se difunden a través del espacio angosto, y se unen selectivamente a moléculas receptoras que se concentran directamente, a través de la hendidura, en la membrana plasmática postsináptica (paso 4, obsérvese figura 4-57). Una molécula de neurotransmisor puede tener uno de dos efectos opuestos, en dependencia del tipo de receptor en la membrana celular objetivo a la que se une:[8]

1. El transmisor unido puede desencadenar la apertura de canales selectivos de cationes en la membrana, lo que conduce en lo primordial a un influjo de iones de sodio y a un potencial de membrana menos negativo (más positivo). Esta despolarización de la membrana postsináptica excita la célula y hace que tenga más probabilidades de responder a este estímulo, o a estímulos posteriores, al generar un potencial de acción propio (obsérvese figura 4-57, pasos 5a y 6).
2. El transmisor enlazado puede desencadenar la apertura de canales selectivos de aniones, lo que conduce principalmente a un influjo de iones cloruro y a un potencial de membrana más negativo (hiperpolarizado). La hiperpolarización de la membrana postsináptica hace que sea menos probable que la célula genere un potencial de acción, porque posteriormente se requiere una mayor entrada de sodio para alcanzar el umbral de la membrana (véase figura 4-57, paso 5b).

La mayoría de las células nerviosas en el cerebro reciben señales tanto excitadoras como inhibidoras de muchas neuronas presinápticas diferentes. Es la suma de estas influencias opuestas lo que determina si se generará o no un impulso en la neurona postsináptica.

Todos los botones terminales de una determinada neurona liberan los mismos transmisores neurológicos. Sin embargo, un neurotransmisor dado puede tener un efecto estimulador sobre una membrana postsináptica particular y un efecto inhibidor sobre otra. Por ejemplo, la acetilcolina inhibe la contractilidad del corazón, pero estimula la del músculo esquelético. Dentro del cerebro el glutamato sirve como neurotransmisor excitador primario, y el ácido gamma aminobutírico (GABA, *gamma-aminobutyric acid*) como el neurotransmisor inhibitorio primario. Varios anestésicos generales, así como el Valium y sus derivados, actúan uniéndose al receptor GABA y potenciando la actividad del interruptor primario "apagado" del cerebro. Como se verá en la siguiente sección, muchos fármacos diferentes que afectan trastornos como la ansiedad, la depresión, el insomnio y la esquizofrenia, ejercen su acción en la sinapsis.

[8] Nótese que esta discusión ignora una clase importante de receptores neurotransmisores que no son canales iónicos, y por tanto no afectan *directamente* el voltaje de la membrana. Este otro grupo de receptores son miembros de una clase de proteínas llamadas GPCR, que se discuten en detalle en la sección 15.3. Cuando un neurotransmisor se une a uno de estos receptores puede iniciar una variedad de respuestas, que a menudo incluyen la apertura de canales iónicos mediante un mecanismo indirecto.

## Acción de fármacos en las sinapsis

Es importante que un neurotransmisor tenga solo una semivida después de su liberación de una neurona presináptica; de lo contrario, el efecto del neurotransmisor se extendería y la neurona postsináptica no se recuperaría. Un neurotransmisor se elimina de la sinapsis de dos maneras: por enzimas que destruyen moléculas neurotransmisoras en la hendidura sináptica, y por proteínas que transportan moléculas neurotransmisoras a las terminales presinápticas, un proceso llamado *recaptación*. Debido a la destrucción o recaptación de las moléculas neurotransmisoras, el efecto de cada impulso no dura más de unos pocos milisegundos.

Interferir con la destrucción o recaptación de neurotransmisores puede tener fatales efectos fisiológicos y de comportamiento. La acetilcolinesterasa es una enzima localizada dentro de la hendidura sináptica que hidroliza la acetilcolina. Comenzamos este capítulo describiendo los terribles efectos del gas nervioso sarín, que funciona al inhibir la acetilcolinesterasa. Cuando esta enzima se inhibe por la exposición al sarín, la posterior acumulación de acetilcolina en las uniones neuromusculares en todo el cuerpo provoca una sobreestimulación de las fibras musculares postsinápticas adyacentes. Como resultado los músculos esqueléticos del cuerpo, incluidos los necesarios para respirar, sufren una contracción violenta seguida de debilidad muscular y parálisis. Los inhibidores más leves de la acetilcolinesterasa se usan para tratar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, que se caracteriza por la pérdida de neuronas liberadoras de acetilcolina.

Muchos fármacos actúan inhibiendo los transportadores que despejan los transmisores neuronales de la hendidura sináptica. Una serie de antidepresivos muy recetados como Prozac y Zoloft inhiben la recaptación de serotonina, un neurotransmisor implicado en los trastornos del estado de ánimo. Por otra parte, la cocaína interfiere con la reabsorción del neurotransmisor dopamina, liberado por ciertas células nerviosas en una porción del cerebro conocida como sistema límbico. El sistema límbico contiene los centros de “placer” o “recompensa” del cerebro. La presencia sostenida de dopamina en las hendiduras sinápticas del sistema límbico produce una sensación efímera de euforia, así como un fuerte deseo de repetir la actividad. Los ratones que han sido modificados genéticamente para carecer del transportador de dopamina (DAT, *dopamine transporter*) —proteína responsable de la recaptación de dopamina— muestran un comportamiento similar al de los ratones normales que recibieron cocaína o anfetaminas. La administración de cocaína o anfetaminas no tiene efectos conductuales adicionales en los animales que carecen del gen *DAT*. Otros numerosos medicamentos actúan sobre las neuronas presinápticas que liberan dopamina, o las postsinápticas que responden a la dopamina. Se cree que las anfetaminas estimulan la liberación excesiva de dopamina desde las terminales presinápticas, y también interfieren con la recaptación de las moléculas neurotransmisoras en la hendidura sináptica. Varios fármacos antipsicóticos se enlazan a ciertos subtipos del receptor de dopamina en las neuronas postsinápticas, y bloquean su estimulación por la dopamina.

El compuesto activo en la marihuana ($\Delta^9$-tetrahidrocannabinol) actúa mediante un mecanismo totalmente diferente. Se une a los receptores cannabinoides (CB1, *cannabinoid*) ubicados en las terminales *presinápticas* de ciertas neuronas del cerebro, lo que reduce la probabilidad de que estas neuronas liberen neurotransmisores. Los receptores CB1 interactúan normalmente con compuestos producidos en el cuerpo llamados *endocannabinoides*. Los endocannabinoides son producidos por las neuronas postsinápticas después de la despolarización. Estas sustancias se difunden “en reversa” a través de la hendidura sináptica hacia la membrana presináptica donde se unen a los receptores CB1, suprimiendo la transmisión sináptica. Los receptores CB1 se localizan en muchas áreas del cerebro, incluyendo el hipocampo, cerebelo, e hipotálamo, lo que explica los efectos de la marihuana en la memoria, la coordinación motora y el apetito, respectivamente. Si la marihuana aumenta el apetito uniéndose a los receptores CB1, se deduce que el bloqueo de estos receptores podría disminuir el apetito. Esta línea de razonamiento llevó al desarrollo de un fármaco de pérdida de peso CB1-bloqueador llamado Acomplia, que se ha retirado del mercado debido a sus efectos secundarios.

## Plasticidad sináptica

Las sinapsis son más que simples sitios de conexión entre las neuronas adyacentes; son un determinante clave en el enrutamiento de los impulsos a través del sistema nervioso. Se cree que el cerebro humano contiene al menos cien mil millones de sinapsis. Estas sinapsis actúan como compuertas estacionadas a lo largo de varias vías, que permiten que algunas partes de la información pasen de una neurona a otra, a la vez que retienen otras partes o las redirigen en otra dirección. Mientras que a menudo las sinapsis se perciben como estructuras fijas e invariables, pueden mostrar una notable cualidad dinámica conocida como “plasticidad sináptica”. La plasticidad sináptica es particularmente importante durante la infancia y la niñez, cuando el circuito neuronal del cerebro alcanza su configuración madura.

La plasticidad sináptica se observa con más facilidad en estudios sobre las neuronas del hipocampo, una parte del cerebro que es de vital importancia en el aprendizaje y la memoria a corto plazo. Cuando las neuronas del hipocampo se estimulan repetidamente durante un corto periodo, las sinapsis que conectan estas neuronas con sus vecinos se “fortalecen” mediante un proceso conocido como potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*) que puede durar días, semanas o incluso más. Las investigaciones sobre la LTP se han centrado en el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA, *N-methyl-D-aspartate*), que es uno de varios tipos de receptores que se unen al neurotransmisor excitatorio glutamato. Cuando el glutamato se une a un receptor NMDA postsináptico, abre un canal de catión interno dentro del receptor que permite la entrada de iones $Ca^{2+}$ en la neurona postsináptica, y desencadena una cascada de cambios bioquímicos que conducen al fortalecimiento sináptico. Las sinapsis que se han sometido a la LTP pueden transmitir estímulos más débiles, y provocar respuestas más fuertes en las células postsinápticas. Se cree que estos cambios realizan un papel importante a medida que la información o los recuerdos recién aprendidos se codifican en los circuitos neuronales del cerebro. Cuando los animales de laboratorio son tratados con medicamentos que inhiben la LTP —como aquellos que interfieren con la actividad del receptor NMDA— su capacidad para aprender nueva información se reduce enormemente.

Existen muchas otras razones por las cuales el estudio de la sinapsis es tan importante. Por ejemplo, se cree que varias enfermedades del sistema nervioso, incluyendo la miastenia gravis, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia e incluso la depresión, tienen sus raíces en la disfunción sináptica.

**REPASO**

1. Describa los pasos entre el momento en que un impulso alcanza el botón terminal de una neurona presináptica y se inicia un potencial de acción en una célula postsináptica.
2. Contraste los roles de las bombas y canales de iones en el establecimiento y uso de gradientes de iones, en particular cuando se aplica a las células nerviosas.

# Preguntas analíticas



1. ¿Qué tipos de proteínas integrales se espera que residieran en la membrana plasmática de una célula epitelial y que podrían estar ausentes en la de un eritrocito? ¿Cómo se relacionan estas diferencias con las actividades de estas células?
2. Muchos tipos diferentes de células poseen receptores que unen hormonas esteroides, que son moléculas solubles en lípidos. ¿En qué parte de la célula cree usted que pueden residir esos receptores? ¿En qué parte de la célula esperaría que residiera el receptor de insulina? ¿Por qué?
3. En la página 140 se calculó que cuando un soluto está 10 veces más concentrado fuera de una célula que dentro, la energía libre para mover el soluto a la célula es –1.4 kcal/mol. ¿Cuál sería el cambio de energía libre para mover el soluto a la célula si la concentración externa (fuera de la célula) fuera mil veces más concentrada que la concentración interna (dentro de la célula)? ¿Cuántas veces mayor debería ser la concentración externa en comparación con la interna para que la energía libre necesaria para mover el soluto sea de –2.8 kcal/mol? Si en cambio la energía libre para mover el soluto a la célula fuera +2.8 kcal/mol, ¿qué le diría a usted sobre la concentración externa en relación con la concentración interna? (Véase **video tutorial cuantitativo**).
4. Suponga que estaba planeando usar liposomas en un intento de administrar medicamentos a un tipo particular de célula en el cuerpo, por ejemplo, una célula adiposa o muscular. ¿Hay alguna manera de que se pueda construir el liposoma para aumentar la especificidad de su objetivo?
5. ¿Cómo es que, a diferencia de los polisacáridos como el almidón y el glucógeno, los oligosacáridos en la superficie de la membrana plasmática pueden estar implicados en interacciones específicas? ¿Cómo se ilustra esta característica al determinar el tipo de sangre de una persona antes de recibir una transfusión?
6. La tripsina es una enzima que puede digerir las porciones hidrofílicas de las proteínas de membrana, pero no puede penetrar en la bicapa lipídica y entrar en una célula. Debido a estas propiedades, la tripsina se ha usado junto con la SDS-PAGE para determinar qué proteínas tienen un dominio extracelular. Describa un experimento que usa tripsina para determinar la lateralidad de las proteínas de la membrana de los eritrocitos.
7. Observe la micrografía electrónica de barrido de eritrocitos en la figura 4-32*a*). Estas células, que son aplanadas y tienen depresiones circulares en cada lado, se dice que tienen una forma bicóncava. ¿Cuál es la ventaja fisiológica de un eritrocito bicóncavo sobre una célula esférica con respecto a la absorción de $O_2$?
8. Suponga que está cultivando una población de bacterias a 15 °C y luego eleva la temperatura del cultivo a 37 °C. ¿Qué efecto cree usted que esto podría tener en la composición de ácidos grasos de membrana? ¿En la temperatura de transición de la bicapa lipídica? ¿En la actividad de las desaturasas de membrana?
9. Observe la figura 4-6. ¿Qué lípidos se esperaría que tengan la mayor velocidad de voltereta? ¿Cuáles la mínima? ¿Por qué? Si determinó experimentalmente que la fosfatidilcolina realmente muestra la mayor velocidad de voltereta, ¿cómo podría explicar este hallazgo? ¿Cómo se puede esperar que la velocidad de voltereta de los fosfolípidos se compare con la de una proteína integral? ¿Por qué?
10. ¿Cuál es la diferencia entre la representación bidimensional y la tridimensional de una proteína de membrana? ¿Cómo se obtienen los diferentes tipos de perfiles y cuál es más útil? ¿Por qué cree usted que hay tantas proteínas más cuya estructura bidimensional se conoce?
11. Si se inyectara un axón gigante de calamar con un pequeño volumen de solución que contiene NaCl 0.1 M y KCl 0.1 M donde los iones $Na^+$ y $K^+$ se marcaron con radiactividad, ¿cuál de los iones marcados esperaría usted que aparezca más rápidamente dentro de un medio de agua de mar mientras la neurona permanece en reposo? ¿Después de que la neurona fuera estimulada para llevar a cabo una serie de potenciales de acción?
12. Ha sido difícil aislar proteínas que contienen canales de agua (es decir, acuaporinas) debido a la alta velocidad de difusión de agua a través de la bicapa lipídica. ¿Por qué esto dificultaría el aislamiento de la acuaporina? ¿Hay alguna manera en que se pueda distinguir la difusión de agua a través de la bicapa lipídica *versus* la que se produce a través de las acuaporinas? El mejor enfoque para estudiar el comportamiento de la acuaporina ha sido expresar los genes de acuaporina en los ovocitos de rana. ¿Hay alguna razón por la que los ovocitos de un anfibio que habita en un estanque sean particularmente adecuados para tales estudios?
13. ¿Cómo es que los coeficientes de difusión medidos para los lípidos dentro de las membranas tienden a ser más cercanos a los esperados para la difusión libre que los medidos para las proteínas integrales en las mismas membranas?
14. Suponga que la membrana plasmática de una célula es repentinamente permeable en el mismo grado tanto al $Na^+$ como a $K^+$, y que ambos iones están presentes en un gradiente de concentración de la misma magnitud. ¿Esperaría que estos dos iones se muevan a través de la membrana a la misma velocidad? ¿Por qué sí, o por qué no?
15. La mayoría de los invertebrados marinos no muestran pérdida o ganancia de agua por ósmosis, mientras que la mayoría de los vertebrados marinos experimentan una pérdida continua de agua en su entorno de alta salinidad. Especule sobre la base de esta diferencia y cómo podría reflejar las diferentes vías de evolución de los dos grupos.
16. ¿Cómo se podría esperar que las concentraciones de soluto dentro de una célula vegetal se comparasen con las de sus fluidos extracelulares? ¿Esperaría lo mismo de las células de un animal?
17. ¿Cuál sería la consecuencia para la conducción de impulsos si los canales de $Na^+$ fueran capaces de reabrir inmediatamente después de haberse cerrado durante un potencial de acción?
18. ¿Cuál sería el valor del potencial de equilibrio del potasio si la concentración externa de $K^+$ es de 200 mM y la concentración interna de 10 mM a 25 °C? ¿A 37 °C?
19. Como se discutió en la página 155, el cotransportador $Na^+$/glucosa transporta dos iones $Na^+$ para cada molécula de glucosa. Si esta relación fuera de 1:1 en lugar de 2:1, ¿cómo afectaría esto la concentración de glucosa a la que el transportador podría trabajar en contra?
20. Una proteína transmembrana por lo general tiene las siguientes características: 1) la porción que transita la bicapa de membrana tiene al menos 20 aminoácidos de longitud, que son en gran parte o exclusivamente residuos no polares; 2) la porción que ancla la proteína en la cara externa tiene dos o más residuos ácidos consecutivos, y 3) la porción que ancla la proteína en la cara citoplásmica tiene dos o más residuos básicos consecutivos. Considere la proteína transmembrana con la siguiente secuencia:

    NH2-MLSTGVKRKGAVLLILLFPWMVAGGPLFWLAADESTYKGS-COOH

    Dibuje esta proteína tal como residiría en la membrana plasmática. Asegúrese de etiquetar los extremos N y C y las caras externas y citoplásmicas de la membrana. (El código de una sola letra para aminoácidos se da en la figura 2-26).
21. Muchos invertebrados marinos, como el calamar, tienen fluidos extracelulares que se asemejan al agua de mar, y por tanto poseen concentraciones de iones intracelulares mucho más altas que los mamíferos. En una neurona de calamar, las concentraciones iónicas son aproximadamente

| Ion | Concentración intracelular | Concentración extracelular |
|---|---|---|
| $K^+$ | 350 mM | 10 mM |
| $Na^+$ | 40 mM | 440 mM |
| $Cl^-$ | 100 mM | 560 mM |
| $Ca^{2+}$ | 2 3 $10^{-4}$ mM | 10 mM |
| pH | 7.6 | 8.0 |

Si el potencial de reposo de la membrana plasmática $V_m$ es –70 mV, ¿alguno de los iones está en equilibrio? ¿Qué tan lejos de estar en equilibrio en mV está cada ion? ¿Cuál es la dirección del movimiento neto de cada ion a través de un canal abierto permeable a ese ion?

22. El potencial de membrana Vm de una célula está determinado por la permeabilidad relativa de la membrana a varios iones. Cuando la acetilcolina se enlaza a sus receptores en la membrana muscular postsináptica, provoca una apertura masiva de canales que son igualmente permeables a los iones de sodio y potasio. Bajo estas condiciones,

$$V_m = (V_{k^+} + V_{Na^+})/2$$

Si $[K^+_{dentro}]$ = 140 mM y $[Na^+_{dentro}]$ = 10 mM para la célula muscular, y $[Na^+_{fuera}]$ = 150 mM y $[K^+_{fuera}]$ = 5 mM, ¿cuál es el potencial membrana de la unión neuromuscular de un músculo estimulado con acetilcolina?

23. Los dominios transmembrana consisten en hélices α individuales o láminas β en forma de barril. Al observar las figuras 2-30 y 2-31, ¿por qué una sola hélice α es más adecuada para abarcar la bicapa que un solo filamento β?
24. Conociendo cómo selecciona el canal $K^+$ los iones de $K^+$, sugiera un mecanismo por el cual el canal de $Na^+$ puede seleccionar su ion.
25. ¿Cómo compararía la velocidad de movimiento de los iones a través de un canal con aquellos transportadores activados por una bomba tipo P? ¿Por qué?

CAPÍTULO 5

# Las mitocondrias y la respiración aeróbica



Vasos sanguíneos del corazón y los pulmones. La sangre pobre en oxígeno (mostrada por vasos azules) está expuesta al mismo en los pulmones, donde se hace rica en oxígeno, como lo indican los vasos rojos

FUENTE: Ralph Hutchings/Getty Images, Inc.

## ¿POR QUÉ NECESITAMOS RESPIRAR?

Cada vez que usted respira y cada vez que su corazón late ocurre porque sus células necesitan oxígeno. Para satisfacer la demanda celular de oxígeno, nuestra sangre se torna roja con la hemoglobina. Gran parte de la anatomía y fisiología humana se dedica a garantizar el suministro adecuado y suficiente de oxígeno, lo cual es una preocupación importante para los anestesiólogos, astronautas y buzos. Como todos saben por experiencia, el ejercicio físico aumenta nuestra necesidad de oxígeno. Este se utiliza para potenciar el metabolismo celular al proporcionar energía a través de la vía bioquímica de la respiración, gran parte de la cual tiene lugar dentro de las mitocondrias las que, como recordamos del capítulo 1, surgieron de las bacterias que se instalaron en los primeros antepasados de las células eucariotas. Así que la próxima vez que se encuentre sin aliento después de subir un tramo de escaleras, tómese un momento y contemple el hecho de que el oxígeno que está tratando de absorber tan desesperadamente es consumido por endosimbiontes derivados de bacterias que viven dentro de sus células. En este capítulo aprenderá cómo el oxígeno se acopla a la producción de energía y qué función desempeñan las mitocondrias durante el proceso respiratorio.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**5.1** Estructura mitocondrial y función
**5.2** Metabolismo aeróbico en la mitocondria
**5.3** **PERSPECTIVA HUMANA:** Función del metabolismo anaeróbico y aeróbico en el ejercicio
**5.4** La fosforilación oxidativa en la formación de la ATP
**5.5** Complejos del transporte de electrones
**5.6** Establecimiento de una fuerza protón motriz
**5.7** La estructura de la ATP sintasa
**5.8** El mecanismo de cambio de la fijación en la formación de ATP
**5.9** Usando el gradiente de protones
**5.10** Peroxisomas
**5.11** **PERSPECTIVA HUMANA:** Enfermedades que resultan de una función mitocondrial o peroxisomal anormal

## 5.1 Estructura mitocondrial y función

Durante los primeros dos mil millones de años en que existió vida en la Tierra, la atmósfera estaba compuesta principalmente por moléculas reducidas, como hidrógeno molecular ($H_2$), amoniaco ($NH_3$) y $H_2O$. La Tierra de este periodo estaba poblada por **anaerobios** —organismos que capturaban y utilizaban energía por medio del metabolismo independiente del oxígeno (anaeróbico), como la glucólisis y la fermentación (figuras 3-24 y 3-29)—. Luego, hace 2 400 a 2 700 mil millones de años, aparecieron las cianobacterias, una nueva clase de organismo que llevaba a cabo un nuevo tipo de proceso fotosintético, en el que las moléculas de agua se dividían y se liberaba oxígeno molecular ($O_2$). En algún momento después de la aparición de las cianobacterias, la atmósfera de la Tierra comenzó a acumular niveles significativos de oxígeno, lo que estableció el escenario para un cambio dramático en los tipos de organismos que vendrían a habitar el planeta.

Como se discute en la página 34, el oxígeno molecular puede ser una sustancia muy tóxica, tomando electrones extras y reaccionando con una variedad de moléculas biológicas. La presencia de oxígeno en la atmósfera debe haber sido un poderoso agente para la selección natural. Con el tiempo, evolucionaron especies que no solo estaban protegidas de los efectos dañinos del oxígeno molecular, sino que poseían vías metabólicas que utilizaban la molécula con gran ventaja. Sin la capacidad de usar oxígeno, los organismos solo podían extraer una cantidad limitada de energía de sus alimentos, excretando productos ricos en energía como el ácido láctico y el etanol, que no podían metabolizar aún más. Por el contrario, los organismos que incorporaron $O_2$ en su metabolismo pudieron oxidar completamente tales compuestos a $CO_2$ y $H_2O$ y, en el proceso, extraer un porcentaje mucho mayor de su contenido de energía. Estos organismos, que se volvieron dependientes del oxígeno, fueron los primeros **aerobios** de la Tierra, y dieron lugar a todas las procariotas y eucariotas dependientes de oxígeno que viven en la actualidad. En las eucariotas, la utilización del oxígeno como medio de extracción de energía se lleva a cabo en un organelo especializado, la **mitocondria**. Como se discute en el capítulo 1, un gran volumen de datos indica que las mitocondrias han evolucionado a partir de una antigua bacteria aeróbica que tomó residencia dentro del citoplasma de una célula huésped anaeróbica.

Las mitocondrias son lo suficientemente grandes como para verse en el microscopio de luz (**FIGURA 5-1*a***), y se conoce su presencia dentro de las células por más de 100 años. Dependiendo del tipo de célula, las mitocondrias pueden tener una estructura general muy diferente. En un extremo del espectro, las mitocondrias pueden aparecer como organelos individuales en forma de frijol (figura 5-1*b*), que varía de 1 a 4 μm de longitud. En el otro extremo del espectro, las mitocondrias pueden aparecer como una red tubular interconectada, muy ramificada. Las observaciones del etiquetado fluorescente de las mitocondrias dentro de las células vivas han demostrado que son organelos dinámicos capaces de cambios dramáticos en la forma. Lo más importante, las mitocondrias pueden fusionarse entre sí o dividirse en dos (**FIGURA 5-2*a***).

Se conoce desde hace muchos años que las mitocondrias y el retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*) participan en extensas interacciones, pero fue una sorpresa descubrir que la fisión mitocondrial es aparentemente inducida por contacto con túbulos delgados del ER. Como se muestra en la figura 5-2*b*), los túbulos del ER pueden rodear la mitocondria como un lazo. Estos túbulos del ER parecen iniciar la constricción, que luego se completa a través de la acción de proteínas solubles que se reclutan por la superficie externa de la mitocondria desde el citosol (figura 5-2*c*). El equilibrio entre la fusión y la fisión es quizás un factor determinante del número mitocondrial, la longitud y el grado de interconexión. Cuando la fusión se vuelve más frecuente que la fisión, las mitocondrias tienden a ser más alargadas e interconectadas, mientras que un predominio de la fisión conduce a la formación de mitocondrias más numerosas y distintas. Una serie de enfermedades neurológicas hereditarias son causadas por mutaciones en los genes que codifican componentes de la maquinaria de fusión mitocondrial.

Las mitocondrias ocupan de 15 a 20% del volumen de células hepáticas promedio en los mamíferos y contienen más de 1 000 proteínas diferentes. Estos organelos son mejor conocidos por su función en la generación del ATP que se utiliza para ejecutar la mayoría de las actividades de la célula que requieren energía. Para lograr esta función, las mitocondrias son a menudo asociadas con gotas de aceite que contienen ácidos grasos de los cuales se derivan materias primas para ser oxidadas. Una disposición de las mitocondrias particularmente llamativa se produce en los es-

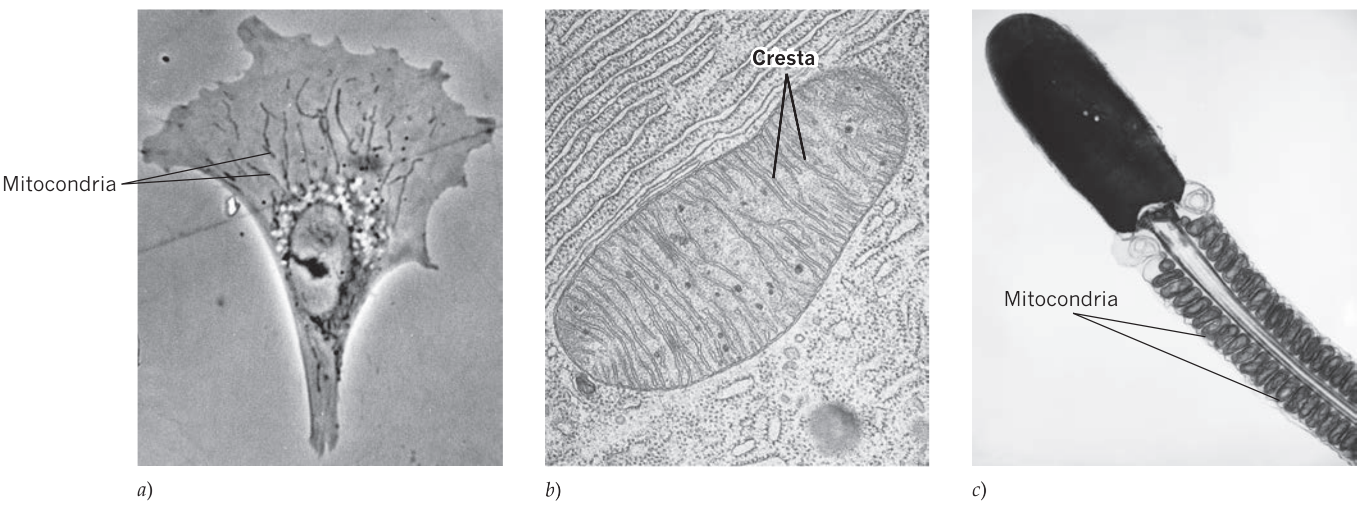
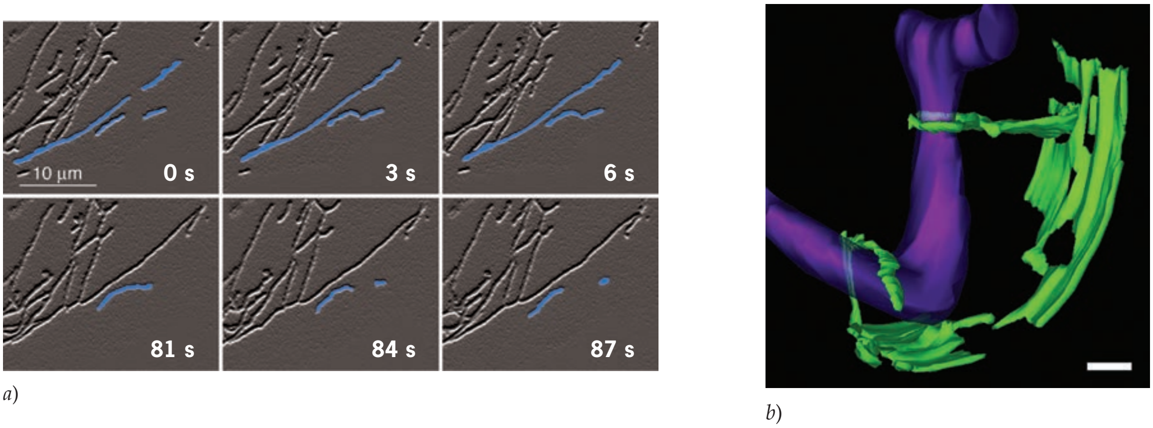



**FIGURA 5-1 Mitocondria.** *a*) Un fibroblasto vivo visto con un microscopio de contraste de fase. Las mitocondrias se observan como cuerpos alargados y oscuros. *b*) La micrografía electrónica de transmisión de una sección delgada a través de una mitocondria que revela la estructura interna del organelo, particularmente la cresta membranosa de la membrana interna. *c*) La localización de la mitocondria en la pieza intermedia que rodea la porción proximal del flagelo de un espermatozoide de murciélago.

FUENTE: *a*) Cortesía de Norman K. Wessels, Universidad de Stanford; *b*) KR Porter/Photo Researchers, Inc.; *c*) Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.



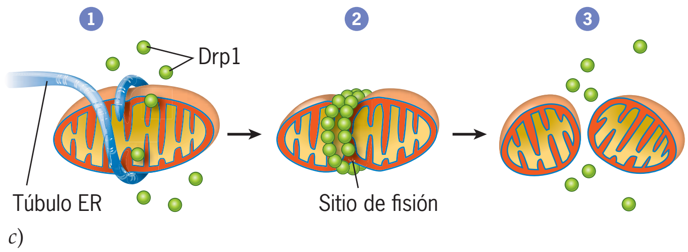




**FIGURA 5-2 Fusión y fisión mitocondriales.** *a*) La naturaleza dinámica de estos organelos se captura en los cuadros de esta película, que muestra una porción de un fibroblasto de ratón cuyas mitocondrias han sido marcadas con una proteína fluorescente. En los primeros tres cuadros, dos pares de mitocondrias (que han sido coloreadas de manera artificial) contactan de extremo a extremo y se fusionan de forma inmediata. En los últimos tres cuadros, el producto de la fusión inferior se somete a fisión, y la mitocondria hija se separa. *b*) El modelo tridimensional de contactos entre el ER (verde) y las mitocondrias (violeta) en una célula de levadura basada en la tomografía EM (sección 18.5). Se observa que los túbulos ER rodean partes de la red mitocondrial de la levadura, marcando sitios de fisión futura. Eventos similares ocurren en las células de los mamíferos. La barra es igual a 200 nm. *c*) En el modelo representado aquí, el contacto con los túbulos del ER inicia el proceso de constricción mitocondrial (paso 1). La fisión es subsecuentemente lograda por proteínas (p. ej., Drp1 en mamíferos) que se ensamblan en hélices alrededor de la superficie externa de la mitocondria (paso 2). La Drp1 es un miembro de la familia dinamina, proteínas ligadas a GTP que intervienen en la separación de estructuras membranosas (véase figura 8-41). La unión e hidrólisis del GTP causa un cambio conformacional en las hélices Drp1 que constriñe completamente la mitocondria, dividiéndola en dos organelos más pequeños (paso 3).

FUENTE: *a*) De David C. Chan. *Cell* 2006;125:1242; © 2006, con permiso de Elsevier; *b*) Imagen de M. West, tomada de Jonathan R. Friedman, *et al*. *Science* 2011;334:359, reimpreso con permiso de AAAS.

permatozoides, donde, a menudo, se ubican en la pieza intermedia, justo detrás del núcleo (figura 5-1*c*). Los movimientos de un espermatozoide son impulsados por el ATP producido en estas mitocondrias. Las mitocondrias también son prominentes en muchas células vegetales donde son los principales proveedores de ATP en tejidos no fotosintéticos, además de ser una fuente de ATP en las células fotosintéticas de las hojas durante los periodos de oscuridad.

Mientras que el metabolismo energético ha sido el foco de interés en el estudio de las mitocondrias, estos organelos también están involucrados en otras actividades. Por ejemplo, las mitocondrias son los sitios de síntesis de numerosas sustancias, incluidos ciertos aminoácidos y los grupos hem que se muestran en las figuras 2-35 y 5-12. Las mitocondrias también desempeñan una función vital en la captación y liberación de iones de calcio. Los iones de calcio son desencadenantes esenciales para las actividades celulares (sección 15-5) y las mitocondrias (junto con el retículo endoplásmico) desempeñan una función importante en la regulación de la concentración de $Ca^{2+}$ del citosol. Por ejemplo, cuando las concentraciones de $Ca^{2+}$ aumentan a niveles anormalmente altos en el citosol, un transportador de $Ca^{2+}$ en la membrana mitocondrial interna acepta parte del exceso de iones $Ca^{2+}$. El proceso de muerte celular, que realiza una enorme función en la vida de todos los animales multicelulares, también se regula en gran medida por los eventos que ocurren dentro de las mitocondrias (sección 15.8).

## Membranas mitocondriales

Si observa con detenimiento la micrografía electrónica de la figura 5-1*b*), se puede ver que el límite externo de una mitocondria contiene dos membranas: la *membrana mitocondrial externa* y la *membrana mitocondrial interna*. La membrana mitocondrial externa encierra completamente a la mitocondria, sirviendo como su límite exterior. La membrana mitocondrial interna se subdivide en dos dominios principales que tienen diferentes proteínas residentes y realizan distintas funciones. Uno de estos dominios, llamado *membrana límite interna*, se encuentra justo dentro de la membrana mitocondrial externa, formando una doble envoltura externa de membrana. La membrana límite interna es rica en las proteínas responsables de la importación de proteínas mitocondriales (véase figura 8-47). El otro dominio de la membrana mitocondrial interna está presente en el interior del organelo como una serie de láminas membranosas invaginadas, llamadas **crestas**. La función de las mitocondrias como transductores de energía está íntimamente ligada a las membranas de las crestas que son tan prominentes en las micrografías electrónicas de estos organelos. Las crestas contienen una gran cantidad de membrana superficial, que alberga la maquinaria necesaria para la respiración aeróbica y la formación de ATP (véase figura 5-22). La organización de las crestas se muestra en un perfil más claro en la micrografía electrónica de barrido de la **FIGURA 5-3*a*)** y en la reconstrucción tridimensional de la figura 5-3*b*). La membrana límite interna y las membranas internas cristalinas están unidas entre sí por conexiones tubulares estrechas, o *uniones de crestas*, como se muestra en las ilustraciones esquemáticas de la figura 5-3*c*). Aún no se conoce del todo cómo se crea exactamente esa compleja organización, pero un complejo proteico asociado a la membrana interna llamado MitOS (también conocido como MICOS o MINOS) se encuentra en las uniones de crestas y se requiere para la organización normal de las crestas.

Las membranas de la mitocondria dividen el organelo en dos compartimentos acuosos, uno dentro del interior de la mitocondria, llamado **matriz**, y un segundo entre la membrana externa y la interna, llamada **espacio intermembranoso**. La matriz tiene una consistencia similar al gel debido a la presencia de una alta

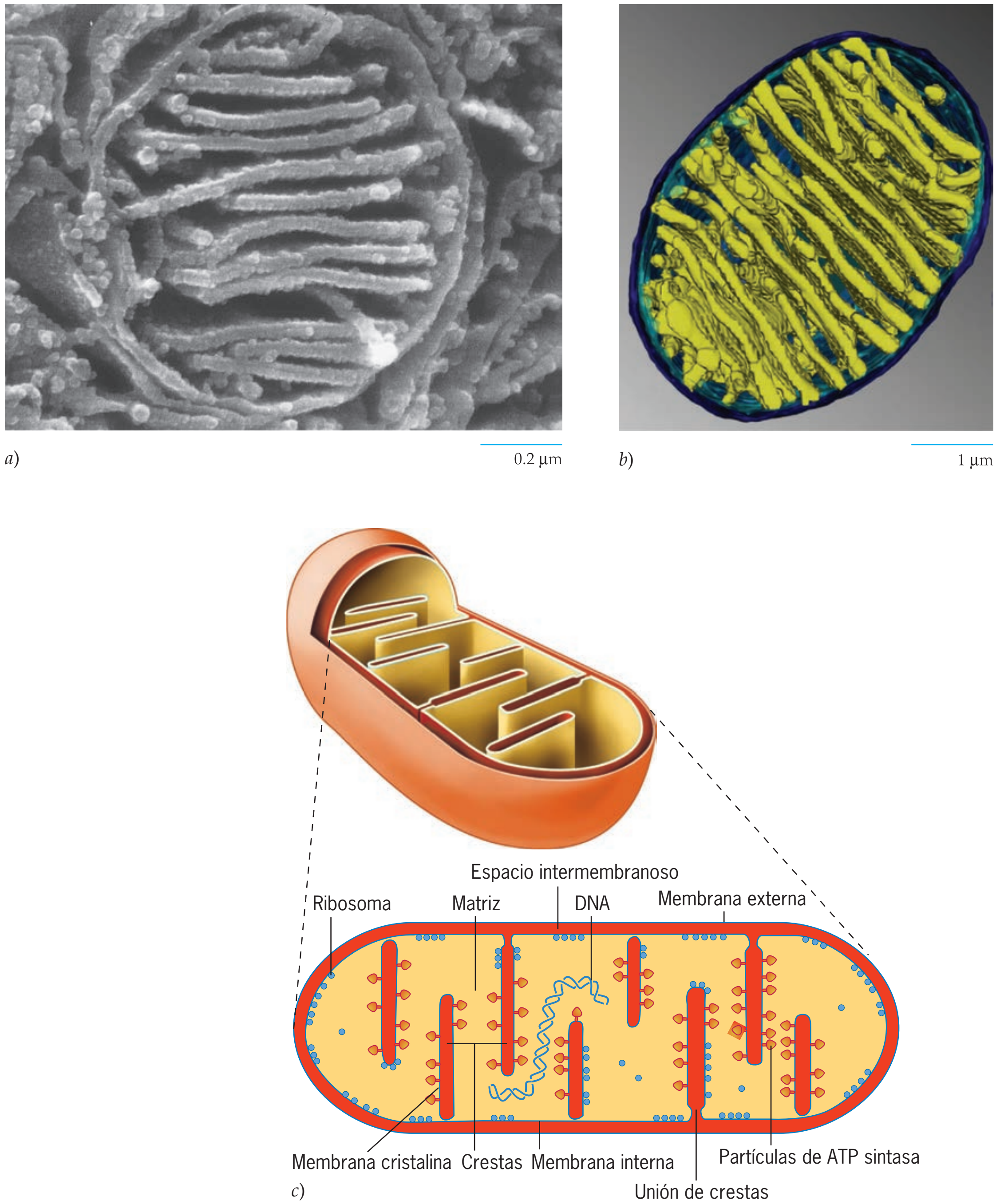



**FIGURA 5-3 La estructura de una mitocondria.** *a*) La microfotografía electrónica de barrido de una mitocondria macerada, que muestra la matriz interna encerrada por pliegues de la membrana interna. *b*) La reconstrucción tridimensional de una mitocondria basada en una serie de micrografías tomadas con un microscopio electrónico de alto voltaje, de una sola sección gruesa de tejido graso marrón que se había inclinado en varios ángulos. Los instrumentos de alto voltaje aceleran los electrones en velocidades que les permiten penetrar secciones de tejido más gruesas (hasta 1.5 µm). Esta técnica sugiere que las crestas están presentes como hojas aplanadas (laminillas) que se comunican con el espacio intermembranoso a través de aberturas tubulares estrechas, en lugar de canales "abiertos" como se representa de forma típica. En esta reconstrucción, la membrana mitocondrial interna se muestra en azul en las regiones periféricas y en amarillo cuando penetra en la matriz para formar las crestas. *c*) Los diagramas esquemáticos que muestran la estructura interna tridimensional (arriba) y una sección delgada (debajo) de una mitocondria del tejido del corazón de bovinos.

FUENTE: *a*) De K. Tanaka y T. Naguro. *Int Rev Cytol* 1980;68:111; *b*) Cortesía de Guy A. Perkins y Terrence G. Frey.

concentración (hasta 500 mg/mL) de proteínas solubles en agua. Las proteínas del espacio intermembranoso se conocen mejor por su función en el inicio del suicidio de la célula, un tema discutido en la sección 15.17.

Las membranas externas e internas tienen propiedades muy diferentes. La membrana externa está compuesta de casi 50% de lípidos por peso y contiene una curiosa mezcla de enzimas involucradas en actividades tan diversas como la oxidación de la epinefrina, la degradación del triptófano y la elongación de los ácidos grasos. Por el contrario, la membrana interna contiene más de 100 polipéptidos diferentes y tiene una relación proteína/lípido muy alta (más de 3:1 por peso, que corresponde a aproxima-

damente una molécula de proteína por cada 15 fosfolípidos). La membrana interna está virtualmente desprovista de colesterol y es rica en un fosfolípido inusual, la cardiolipina (difosfatidilglicerol; véase figura 4-6 para la estructura), que son características de membranas plasmáticas bacterianas, de las cuales supuestamente ha evolucionado la membrana mitocondrial interna. La cardiolipina realiza una función importante en facilitar la actividad de varios de los grandes complejos proteicos implicados en el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Se considera que la membrana mitocondrial externa es homóloga a una membrana externa presente como parte de la pared celular de ciertas células bacterianas. La membrana mitocondrial externa y la membrana bacteriana externa contienen *porinas*, proteínas integrales que tienen un canal interno relativamente grande (p. ej., 2-3 nm) rodeado por un barril de cadenas β (**FIGURA 5-4**). Las porinas de la membrana mitocondrial externa no son estructuras estáticas como se pensó una vez, pero pueden someterse a un cierre reversible en respuesta a las condiciones dentro de la célula. Cuando los canales de porinas se abren de manera amplia, la membrana externa es permeable a moléculas como ATP, NAD y la coenzima A, que desempeñan una función clave en el metabolismo energético de la mitocondria. Por el contrario, la membrana mitocondrial interna es altamente impermeable; virtualmente todas las moléculas y iones requieren transportadores de membrana especiales para ganar entrada a la matriz.

Como se discutirá en las siguientes secciones, la composición y organización de la membrana mitocondrial interna son la clave para las actividades bioenergéticas del organelo. La arquitectura de la membrana interna y la aparente fluidez de su bicapa facilitan las interacciones de los componentes que se requieren para la formación de ATP.

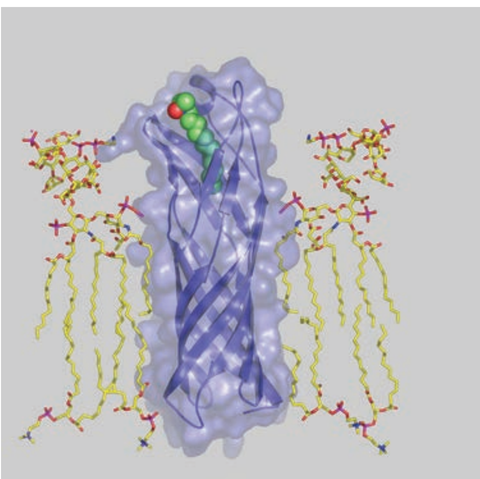


**FIGURA 5-4 Porinas.** Las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa que contiene lípidos fuera de su membrana plasmática como parte de su pared celular. Esta membrana externa contiene proteínas, llamadas porinas, que consisten en un barril de hojas β y forman una abertura a través de la cual las moléculas de tamaño moderado pueden penetrar. En esta imagen se muestra a la proteína OmpW incrustada en la membrana externa de la *E. coli*. Las porinas contienen un pequeño compuesto hidrofóbico dentro de su canal central. Una variedad de porinas que tienen diferentes tamaños de canales y selectividades también se encuentran en la membrana mitocondrial externa en células eucariotas.

FUENTE: Tomada de Heedeok Hong, *et al. J Biol Chem* 2006; portada del #11:281; © 2006, Sociedad Americana de Bioquímica y Biología Molecular; imagen cortesía de Bert van den Berg.

## La matriz mitocondrial

Además de una serie de enzimas, la matriz mitocondrial también contiene ribosomas (de tamaño mucho más pequeño que los encontrados en el citosol) y varias moléculas de DNA, que es circular en plantas y animales superiores (figura 5-3*c*). Por tanto, las mitocondrias poseen su propio material genético y la maquinaria para fabricar sus propios RNA y proteínas. Este DNA no cromosómico es importante porque codifica una pequeña cantidad de polipéptidos mitocondriales (13 en humanos) que están estrechamente integrados en el interior de la membrana mitocondrial junto con polipéptidos codificados por genes que residen dentro del núcleo. El DNA mitocondrial humano también codifica a 2 RNA ribosomales y a 22 tRNA que se utilizan en la síntesis de proteínas dentro del organelo. El DNA mitocondrial (mtDNA, *mitochondrial DNA*) es una reliquia de la historia antigua. Se cree que es el legado de una bacteria aeróbica simple que tomó residencia en el citoplasma de una célula primitiva que finalmente se convirtió en la antepasada de todas las células eucariotas (página 26). La mayoría de los genes de este antiguo simbionte se perdieron o se transfirieron en el transcurso de la evolución al núcleo de la célula huésped, dejando solo un puñado de genes para codificar algunas de las proteínas más hidrofóbicas de la membrana mitocondrial interna. Es interesante notar que la RNA polimerasa que sintetiza los diversos RNA mitocondriales no está relacionada con la enzima multisubunidad encontrada en células procariotas y eucariotas. En cambio, la RNA polimerasa mitocondrial es una enzima de subunidad única, similar en muchos aspectos a ciertos virus bacterianos (bacteriófagos) de los cuales parece haber evolucionado. Por una serie de razones, el mtDNA es muy adecuado para su uso en el estudio de la migración humana. Una cantidad de compañías, por ejemplo, emplean secuencias de mtDNA para rastrear la ascendencia de clientes que buscan sus raíces étnicas o geográficas.

Más adelante en el capítulo se volverá a analizar la arquitectura molecular de las membranas mitocondriales, pero primero se considerará la función de estos organelos en las vías oxidativas básicas de las células eucariotas, que se resume en la **FIGURA 5-5**. Podría ser de ayuda el examen de esta descripción general y la lectura de la leyenda que lo acompaña, antes de continuar con las siguientes descripciones detalladas de estas vías.

**REPASO**

1. Describa los cambios metabólicos en el metabolismo de oxidación que debe haber acompañado a la evolución y éxito de las cianobacterias.
2. Compare las propiedades y la historia evolutiva de las membranas mitocondriales internas y externas, el espacio intermembranoso y la matriz.

## 5.2 Metabolismo aeróbico en la mitocondria

En el capítulo 3 se describen las etapas iniciales en la oxidación de los carbohidratos. Comenzando con la glucosa, los primeros pasos del proceso de oxidación se llevan a cabo por las enzimas de la glucólisis, que se encuentran en el citosol (figura 5-5). Las 10 reacciones que constituyen la vía glucolítica se ilustran en la figura 3-24; los principales pasos de la vía se resumen en la **FIGURA 5-6**. Solo una pequeña fracción de la energía libre disponible como glucosa está a disposición de la célula durante la glucólisis, suficiente para la síntesis neta de solo dos moléculas de ATP por

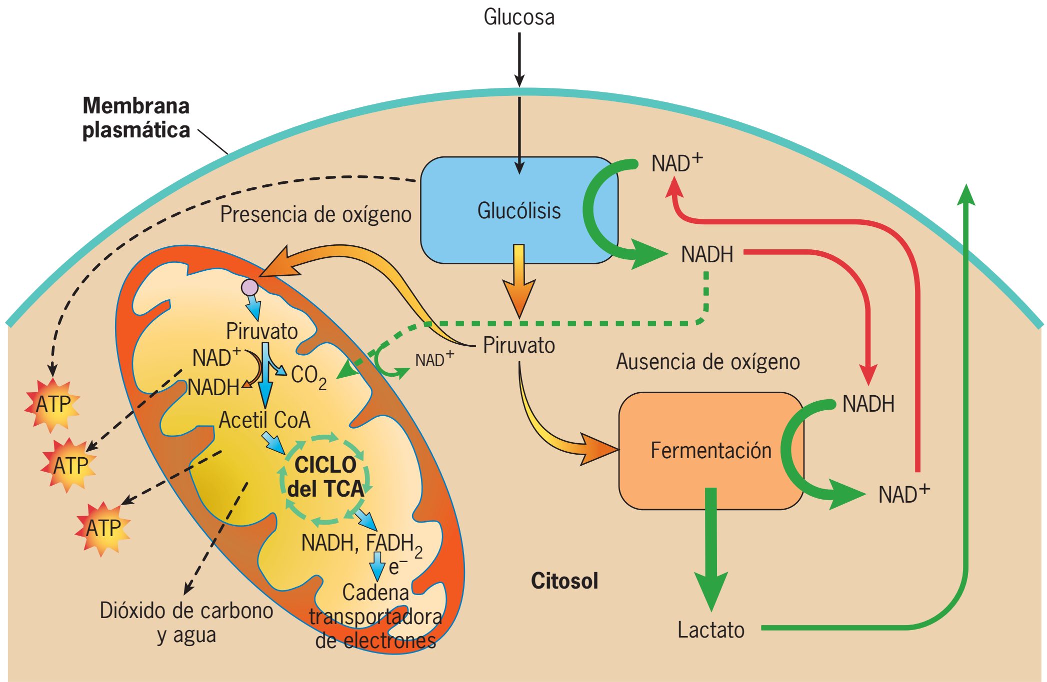



**FIGURA 5-5 Un resumen del metabolismo de los carbohidratos en las células eucariotas.** Las reacciones de la glucólisis generan piruvato y NADH en el citosol. En ausencia del $O_2$, el NADH reduce el piruvato a lactato (u otro producto de fermentación, como el etanol en la levadura, véase figura 3-29 para más detalles). El $NAD^+$ formado en la reacción se reutiliza en la continuación de la glucólisis. En presencia del $O_2$, el piruvato se mueve hacia la matriz (facilitado por un transportador de membrana), donde se descarboxila y se une a la coenzima A (CoA, *coenzyme A*), una reacción que genera NADH. El NADH producido durante la glucólisis dona sus electrones de alta energía a un compuesto que cruza la membrana mitocondrial interna (como se muestra en la figura 5-9). La acetil CoA pasa a través del ciclo del TCA (como se muestra en la figura 5-7), que genera NADH y $FADH_2$. Los electrones en estas diversas moléculas NADH y $FADH_2$ pasan a lo largo de la cadena transportadora de electrones, la cual está compuesta por transportadores que están incrustados en la membrana mitocondrial interna, al oxígeno molecular ($O_2$). La energía liberada durante el transporte de electrones se usa en la formación de ATP mediante un proceso que se discute con más detalle más adelante en este capítulo. Si toda la energía del transporte de electrones fuera a ser utilizada en la formación de ATP, podrían generarse cerca de 36 ATP de una sola molécula de glucosa.

molécula de glucosa oxidada (figura 5-6). La mayor parte de la energía permanece almacenada como piruvato. Cada molécula de NADH producida durante la oxidación de la gliceraldehído-3-fosfato (reacción 6, figura 5-6) también porta un par de electrones de alta energía.[1] Los dos productos de la glucólisis —piruvato y NADH— pueden metabolizarse en dos formas muy diferentes, dependiendo del tipo de célula en la que se forman y la presencia o ausencia de oxígeno.

En presencia de $O_2$, los organismos aeróbicos pueden extraer grandes cantidades de energía adicional del piruvato y el NADH producido durante la glucólisis —suficiente para sintetizar más de 30 moléculas adicionales de ATP—. Esta energía se extrae en las mitocondrias (figura 5-5). Comenzaremos con el piruvato y volveremos a considerar el destino del NADH más adelante en la discusión. Cada molécula de piruvato producido por la glucólisis se transporta a través de la membrana mitocondrial interna y en la matriz, donde se descarboxila para formar un grupo acetilo de dos carbonos (—$CH_3COO$—). El grupo acetilo se transfiere a la *coenzima A* (un compuesto orgánico complejo derivado de la vitamina ácido pantoténico) para producir acetil CoA.

$$\text{Piruvato} + \text{HS—CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetil CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

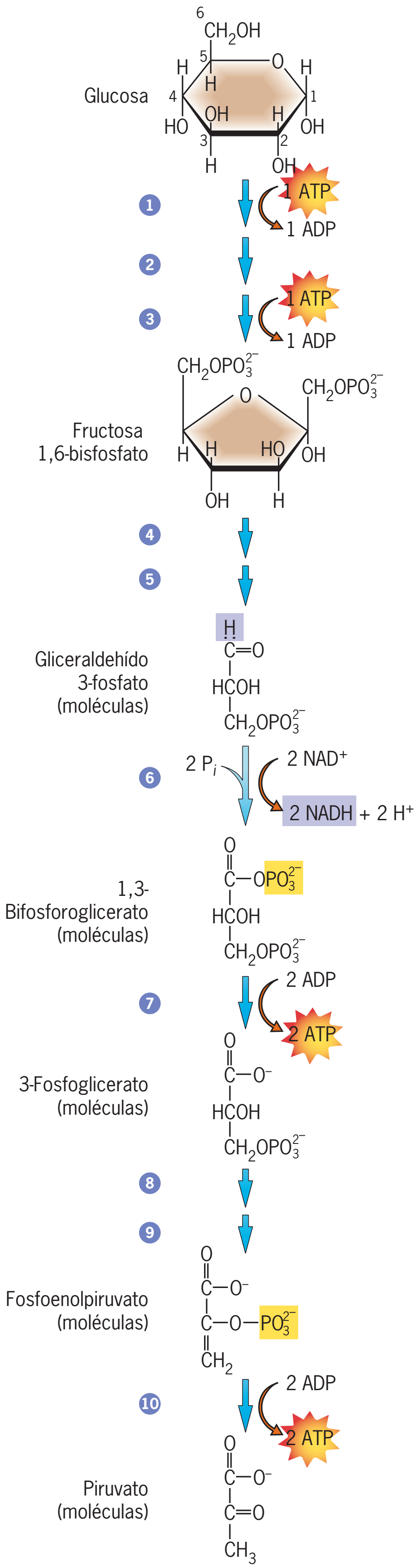
[1] Los términos *electrones de alta energía* y *electrones de baja energía* no siempre son bien recibidos por los bioquímicos, pero transmiten una imagen útil. Como se discute en la página 180, los electrones de alta energía son aquellos que se mantienen con menor afinidad y se transfieren más fácilmente de un donante a un receptor que los electrones de baja energía.

La descarboxilación del piruvato y la transferencia del grupo acetilo a CoA (figuras 5-5 y 5-7) junto con la reducción de $NAD^+$ se cataliza por el complejo multienzimático gigante piruvato deshidrogenasa, cuya estructura se muestra en la figura 2-41.

## El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, *tricarboxylic acid*)

Una vez formada, la acetil CoA se alimenta de una vía cíclica, llamada **ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)**, donde se oxida el sustrato y se conserva su energía. Aparte de la succinato deshidrogenasa, que está unida a la membrana interna, todas las enzimas del ciclo del TCA residen en la fase soluble de la matriz (figura 5-5). El ciclo del TCA también se conoce como el **ciclo de Krebs** después que el bioquímico británico Hans Krebs trabajara en la descripción de la vía en la década de 1930, o **ciclo del ácido cítrico**, a partir de una molécula clave formada en la vía.

El primer paso en el ciclo de TCA es la condensación del grupo acetilo de dos carbonos con un oxaloacetato de cuatro carbonos para formar una molécula de citrato de seis carbonos (**FIGURA 5-7**, paso 12). Durante el ciclo, la molécula de citrato disminuye en la longitud de la cadena, un carbono a la vez, regenerando la molécula de oxaloacetato de cuatro carbonos, que se puede condensar con otra acetil CoA. Son los dos carbonos que se eliminan durante el ciclo del TCA (que no son los mismos que fueron traídos con el grupo acetilo) que están completamente oxidados a dióxido de carbono. Durante el ciclo del TCA, ocurren cuatro reacciones en las que un par de electrones se transfieren de un sustrato a una coenzima que acepta electrones. Tres de las reacciones reducen $NAD^+$ a NADH, y una reacción reduce




La glucosa se fosforila a expensas de un ATP, reajustado de manera estructural para formar fructosa 1,6 bifosfato, y luego se fosforila otra vez a expensas de un segundo ATP. Los dos grupos fosfatos están situados en los dos terminales (C1, C6) de la cadena de la fructosa.

El bifosfato de seis carbonos se divide en dos monofosfatos de tres carbonos.

El aldehído de tres carbonos se oxida a un ácido a medida que los electrones eliminados del sustrato se utilizan para reducir la coenzima NAD$^+$ a NADH. Además, el ácido C1 se fosforila para formar un acil fosfato, que tiene un alto potencial de transferencia de grupo de fosfato (indicado por el sombreado amarillo).

El grupo de fosfato del C1 se transfiere al ADP formando ATP mediante la fosforilación a nivel del sustrato. Se forman dos ATP por cada glucosa oxidada.

Estas reacciones resultan en la reorganización y deshidratación del sustrato para formar un enol fosfato en la posición C2 que tiene un alto potencial de transferencia del grupo fosfato.

El grupo fosfato se transfiere del ADP formando ATP por fosforilación a nivel del sustrato, generando una cetona en la posición C2. Se forman dos ATP de la glucosa oxidada.

**Reacción neta:**

$$\text{Glucosa} + 2\,\text{NAD}^+ + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{P}_i \longrightarrow 2\,\text{Piruvato} + 2\,\text{ATP} + 2\,\text{NADH} + 2\,\text{H}^+ + 2\,\text{H}_2\text{0}$$

**FIGURA 5-6 Un resumen de la glucólisis que muestra algunos de los pasos clave.** Estos incluyen las dos reacciones en las que se transfieren los grupos fosfato del ATP al azúcar de seis carbonos para producir fructosa 1,6-bisfosfato (pasos 1, 3); la oxidación y fosforilación del gliceraldehído 3-fosfato para producir 1,3-bisfosfoglicerato y NADH (paso 6); y la transferencia de grupos fosfato de sustratos fosforilados de tres carbonos a ADP para producir ATP por fosforilación del sustrato (pasos 7 y 10). Tenga en cuenta que dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato se forman a partir de cada molécula de glucosa, por lo que las reacciones de la 6 a la 10 que se muestran aquí ocurren dos veces por molécula de glucosa oxidada.

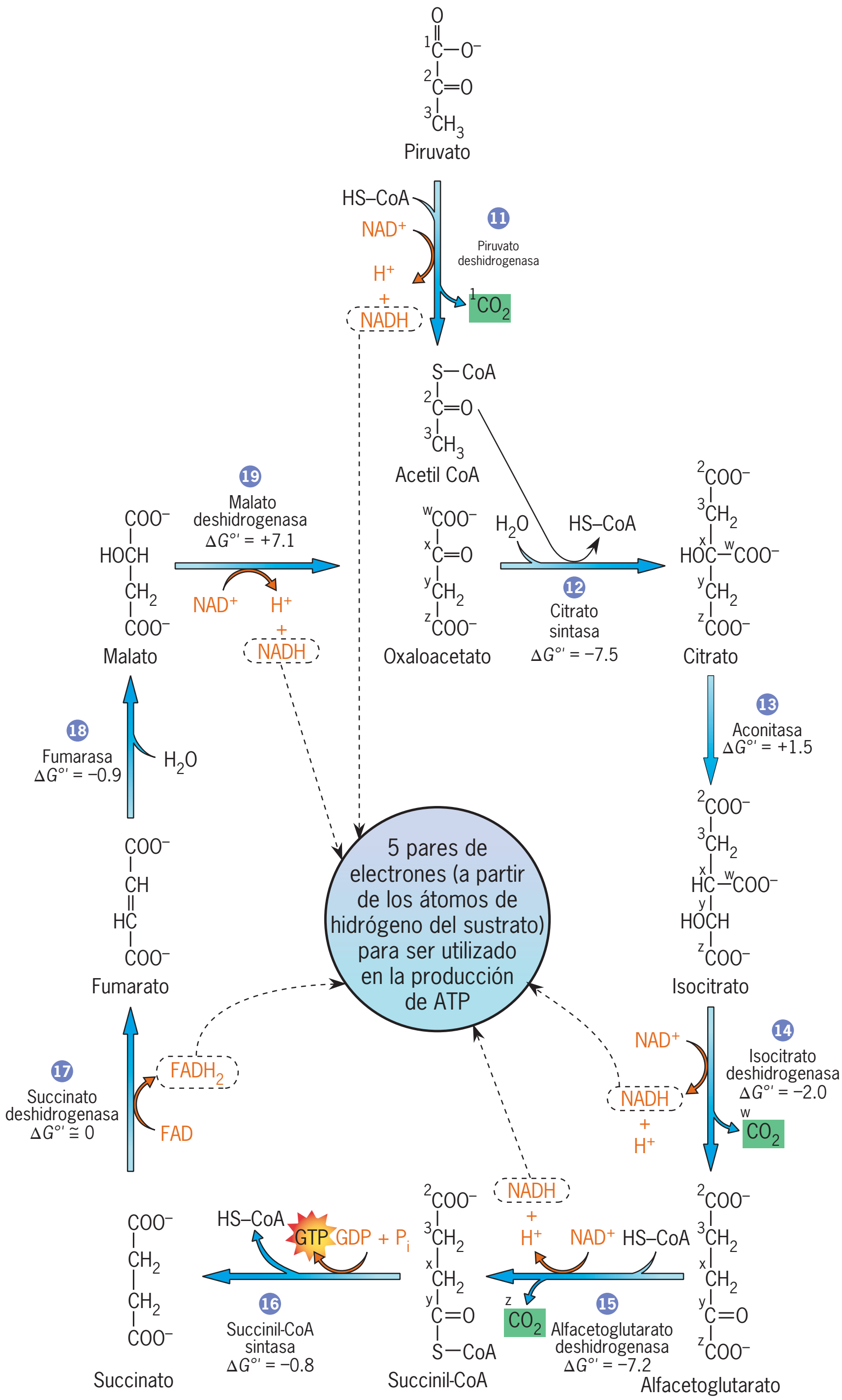



**FIGURA 5-7 El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA).** El ciclo comienza con la condensación del oxaloacetato (OAA, *oxaloacetate*) y la acetil CoA (reacción 12). Los carbonos de estos dos compuestos están marcados con números o letras. Los dos carbonos que se pierden durante el paso a través del ciclo se derivan del oxaloacetato. Las energías libres estándares (en kcal/mol) y los nombres de las enzimas también se prevén. Cinco pares de electrones se eliminan de las moléculas del sustrato por la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo del TCA. Estos electrones de alta energía se transfieren al $NAD^+$ o al FAD y luego pasan a través de la cadena transportadora de electrones para su uso en la producción de ATP. Las reacciones que se muestran aquí comienzan con el número 11 porque la vía continúa donde se quedó la última reacción de la glucólisis (número 10 de la figura 5-6).

FAD a FADH2 (figura 5-7). La ecuación neta de las reacciones del ciclo de TCA se puede escribir como

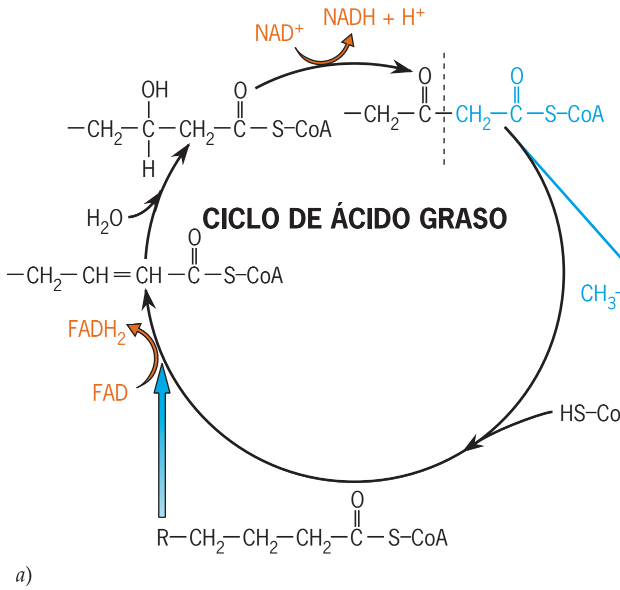
$$\text{Acetil CoA} + 2H_2O + FAD + 3NAD^+ + GDP + P_i \rightarrow 2CO_2 + FADH_2 + 3NADH + 3H^+ + GTP + HS{-}CoA$$

El ciclo del TCA es una vía metabólica críticamente importante. Si se considera la posición del ciclo del TCA en el metabolismo total de la célula (**FIGURA 5-8**, véase también figura 3-22), se encuentra que los metabolitos de este ciclo son los mismos compuestos generados por la mayoría de las vías catabólicas de la célula. La acetil CoA, por ejemplo, es un producto final importante de una serie de vías catabólicas, incluyendo el desmontaje de los ácidos grasos, que se degradan dentro de la matriz de la mitocondria en dos unidades de carbono (figura 5-8*a*). Estos compuestos de dos carbonos entran en el ciclo del TCA como acetil CoA. El catabolismo de los aminoácidos también genera metabolitos del ciclo del TCA (figura 5-8*b*), que ingresan a la matriz por medio de sistemas de transporte especiales en la membrana mitocondrial interna. Es evidente que todas las macromoléculas que proporcionan energía a una célula (polisacáridos, grasas y proteínas) se descomponen en los metabolitos del ciclo de TCA. Por tanto, la mitocondria se convierte en el foco para los pasos de conservación de la energía final en el metabolismo independientemente de la naturaleza del material de partida.

## Importancia de las coenzimas reducidas en la formación de ATP

Es evidente a partir de la ecuación neta del ciclo del TCA que los productos principales de la vía son las coenzimas reducidas $FADH_2$ y NADH, los cuales contienen los electrones de alta energía eliminados de varios sustratos a medida que se oxidan. El NADH también fue uno de los productos de la glucólisis (junto con el piruvato). Las mitocondrias no son capaces de importar el NADH formado en el citosol durante la glucólisis. En cambio, los electrones del NADH citosólico se utilizan para reducir un metabolito de bajo peso molecular que puede 1) entrar en la mitocondria (por un vía llamada sistema de transporte del malato-aspartato) y reducir $NAD^+$ a NADH, o 2) transferir sus electrones al FAD (por una vía llamada sistema de transporte del glicerol fosfato, la cual se muestra en la **FIGURA 5-9**) para producir $FADH_2$. Ambos mecanismos permiten que los electrones de NADH citosólico alimenten la cadena transportadora de electrones mitocondriales utilizados para la formación de ATP.

Ahora que hemos explicado la formación de NADH y $FADH_2$ mediante la glucólisis y el ciclo del TCA, podemos recurrir a los pasos que utilizan estas coenzimas reducidas para producir ATP.



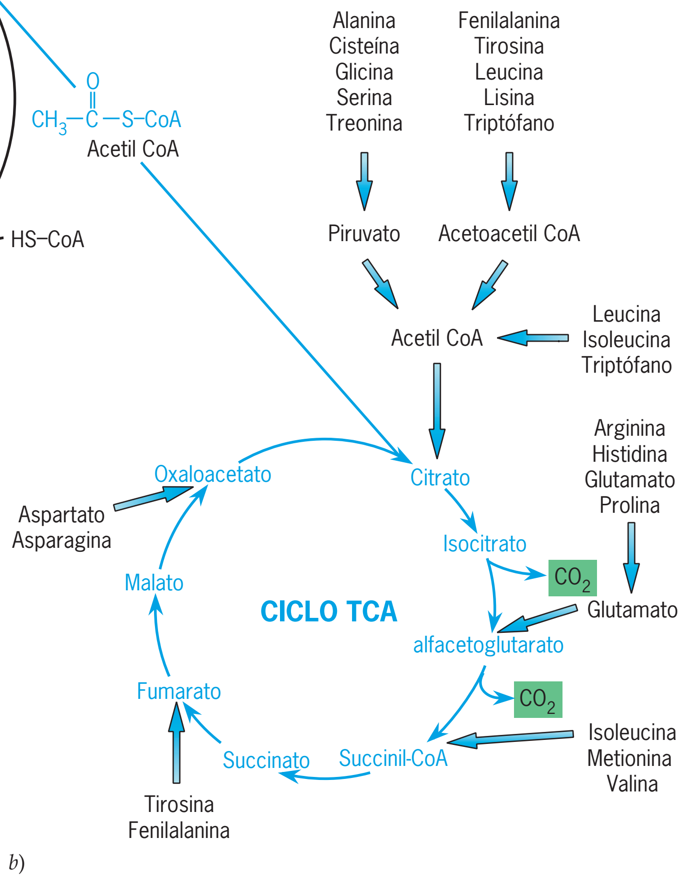




**FIGURA 5-8 Las vías catabólicas generan compuestos que se alimentan en el ciclo TCA.** *a*) Oxidación de ácidos grasos. El primer paso en la oxidación de un ácido graso es su activación por el enlace con el tiol (—SH) grupo de coenzima A, que ocurre después de que el grupo acilo graso se transporta a través de la membrana mitocondrial interna en asociación con una proteína transportadora (no se muestra). En la mitocondria, el acilo graso de la molécula de CoA se somete a un desmontaje gradual en el que un acetil CoA (se muestra en azul) se elimina de la cadena del ácido graso con cada ronda del ciclo. Además de la molécula de acetil CoA que se alimenta en el ciclo del TCA, cada ronda del ciclo de ácidos grasos produce un NADH y un $FADH_2$. Es evidente en el examen de esta serie de reacciones por qué las grasas son un depósito tan rico de energía química. *b*) Entrada de los aminoácidos en el ciclo del TCA.

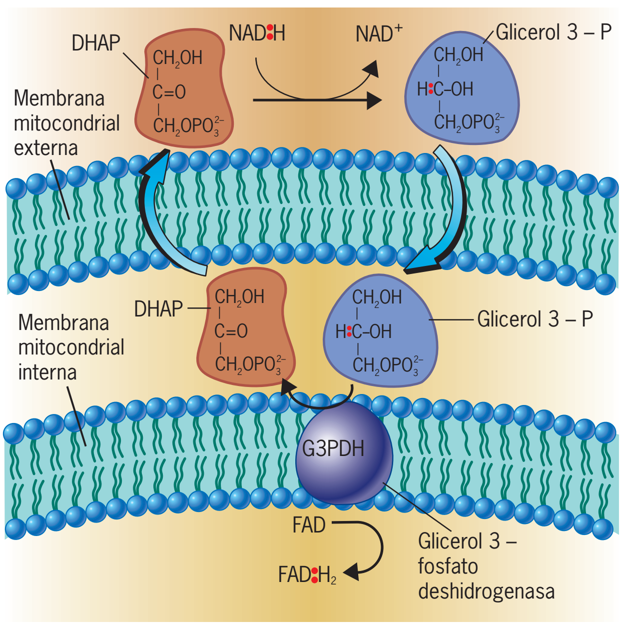



**FIGURA 5-9 El sistema de transporte del fosfato de glicerol.** En el sistema de transporte del fosfato de glicerol, los electrones se transfieren desde NADH a la dihidroxiacetona fosfato (DHAP, *dihydroxyacetone phosphate*) para formar el glicerol 3-fosfato, que los transporta a la mitocondria. Estos electrones luego reducen el FAD en la membrana mitocondrial interna, formando el FADH2, que puede transferir los electrones a un transportador de la cadena transportadora de electrones.

El proceso general se puede dividir en dos pasos, que se pueden resumir como sigue:

**Paso 1** (**FIGURA 5-10**). ***Los electrones de alta energía se trasfieren a partir de FADH2 o NADH*** a la primera de una serie de transportadores de electrones que componen la cadena transportadora de electrones, la cual se encuentra en el interior de la membrana mitocondrial. Los electrones pasan a lo largo de la cadena transportadora de electrones en reacciones que liberan energía. Estas reacciones están acopladas a cambios conformacionales que requieren energía en los transportadores de electrones que mueven los protones hacia afuera a través de la membrana mitocondrial interna. Como resultado, la energía liberada durante el transporte de electrones se almacena en la forma de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Eventualmente, los electrones de baja energía se transfieren al receptor de electrones terminal, denominado, oxígeno molecular ($O_2$), que se reduce a agua.

**Paso 2 (figura 5-10)**. ***El movimiento controlado de protones los regresa a través de la membrana*** mediante una enzima sintetizadora de ATP, que provee la energía requerida para fosforilar ADP a ATP.

La importancia de los movimientos de protones durante el transporte de electrones y la formación de ATP fue propuesta por primera vez en 1961 por Peter Mitchell de la Universidad de Edimburgo, que lo nombró el mecanismo quimiosmótico. Durante

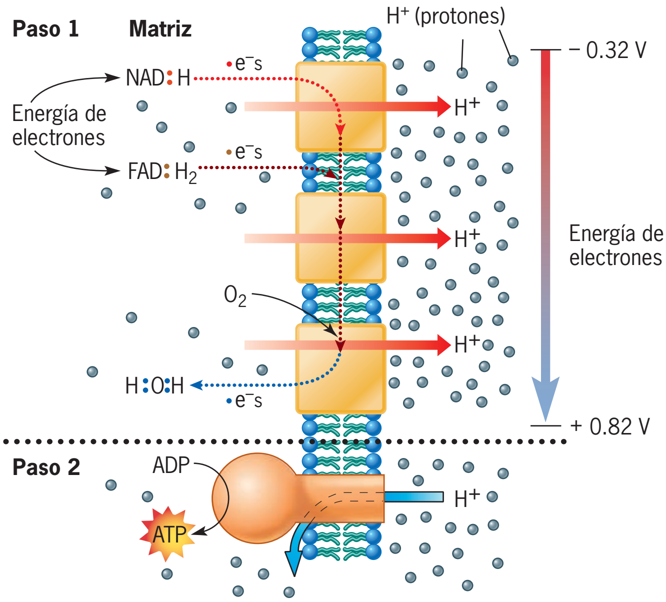



**FIGURA 5-10 Un resumen del proceso de fosforilación oxidativa.** En el primer paso del proceso, sustratos como el isocitrato y el succinato se oxidan (figura 5-7) y los electrones se transfieren a las coenzimas $NAD^+$ o FAD para formar NADH o $FADH_2$. Estos electrones de alta energía son luego transferidos a través de una serie de transportadores de la cadena transportadora de electrones. La energía liberada se usa para translocar los protones desde la matriz al espacio intermembranoso, estableciendo un gradiente de protones electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. En el paso 2, los protones se mueven hacia el gradiente electroquímico abajo, a través de la síntesis del complejo ATP. La energía almacenada en el gradiente se utiliza para sintetizar ATP. Estos dos pasos esenciales de la fosforilación oxidativa forman la base del mecanismo quimiosmótico propuesto por Peter Mitchell en 1961.

gran parte del resto del capítulo nos ocupará el análisis adicional de los dos pasos resumidos arriba.

Cada par de electrones transferidos de NADH al oxígeno por medio de la cadena transportadora de electrones libera suficiente energía para impulsar la formación de alrededor de tres moléculas de ATP. Cada par donado por el $FADH_2$ libera energía suficiente para impulsar la formación de casi dos moléculas de ATP. Si uno suma todos los ATP formados a partir de una molécula de glucosa completamente catabolizada por medio de la glucólisis y el ciclo del TCA, la ganancia neta es de alrededor de 36 ATP (que incluye el GTP formado por cada ronda del ciclo del TCA), paso 16, figura 5-7). El número real de ATP formados por cada molécula de glucosa oxidada depende de las actividades particulares en que la célula está ocupada. La importancia relativa de la glucólisis frente al ciclo de TCA, es decir, de metabolismo de oxidación anaeróbica frente al aeróbico, en la función del músculo esquelético humano se discute en “Perspectiva humana”.



**REPASO**

1. ¿Cómo están conectados los dos productos de la glucólisis a las reacciones del ciclo del TCA?
2. ¿Por qué el ciclo del TCA se considera la vía central en el metabolismo energético de una célula?
3. Describa el mecanismo por el cual el NADH producido en el citosol por glucólisis es capaz de alimentar a los electrones en el ciclo del TCA.

# 5.3 PERSPECTIVA HUMANA

## Función del metabolismo anaeróbico y aeróbico en el ejercicio

La contracción muscular consume grandes cantidades de energía para deslizar los filamentos que contienen actina y miosina unos sobre otros, como se discute en el capítulo 9. La energía que impulsa la contracción muscular se deriva del ATP. La tasa de hidrólisis del ATP aumenta más de 100 veces en un músculo esquelético sometido a contracción máxima, comparado con el mismo músculo en reposo. Se estima que el músculo esquelético humano promedio tiene suficiente ATP disponible para alimentar una contracción vigorosa durante 2 a 5 s. Incluso como el ATP se hidroliza, es importante que se produzca ATP adicional; de lo contrario, la relación ATP/ADP caería y con ella la energía libre disponible por disminución del combustible. Para resolver este problema, las células musculares contienen una reserva de fosfato de creatina (CrP, *creatine phosphate*), uno de los compuestos con un potencial de transferencia de fosfato mayor que el del ATP (véase figura 3-28), y por tanto, puede ser utilizado para generar ATP en la siguiente reacción:

$$\text{CrP} + \text{ADP} \longrightarrow \text{Cr} + \text{ATP}$$

Los músculos esqueléticos típicamente tienen suficiente fosfato de creatina almacenado para mantener niveles elevados de ATP durante casi 15 s. Este consumo de creatina por músculo es la razón por la que los levantadores de pesas a veces toman suplementos de creatina. Debido a que las células del músculo tienen un suministro limitado de ATP y fosfato de creatina, se deduce que la actividad muscular intensa o sostenida requiere de la formación de cantidades adicionales de ATP, las cuales deben obtenerse por el metabolismo oxidativo.

Los músculos esqueléticos humanos están compuestos de células alargadas, contráctiles, conocidas como fibras. Las fibras musculares son de dos tipos generales (**FIGURA 1**): las fibras de contracción rápida, que pueden contraerse de forma muy rápida (p. ej., 15-40 ms), y fibras de contracción lenta, que se contraen de manera más lenta (p. ej., 40-100 ms). Las fibras de contracción rápida se observan bajo el microscopio electrónico, por estar casi desprovistas de mitocondrias, lo que indica que estas células no pueden producir mucho ATP por la respiración aeróbica. Por otro lado, las fibras de contracción lenta contienen grandes cantidades de mitocondrias. Estos dos tipos de fibras musculares esqueléticas son adecuadas para diferentes tipos de actividades. Por ejemplo, levantar pesas o correr a toda velocidad depende principalmente de las fibras de contracción rápida, que son capaces de generar más fuerza que sus contrapartes de contracción lenta. Las fibras de contracción rápida producen casi todo su ATP de forma anaeróbica como resultado de la glucólisis. Aunque solo la glucólisis produce alrededor de 5% como mucho del ATP por cada molécula de glucosa oxidada, en comparación con la

(continúa)

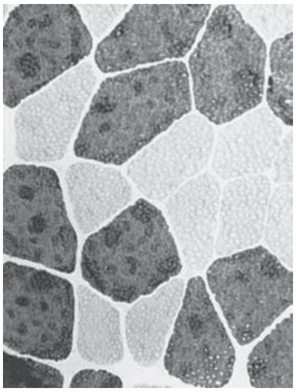


**FIGURA 1.** Los músculos esqueléticos contienen una mezcla de fibras de contracción rápida (o tipo II) (teñido de oscuro) y fibras de contracción lenta (o tipo I) (ligeramente teñidas).

FUENTE: Cortesía de Duncan MacDougall.

respiración aeróbica; las reacciones de la glucólisis ocurren mucho más rápido que las del ciclo del TCA y el transporte de electrones; por tanto, la tasa de producción anaeróbica del ATP es en realidad más alto que la lograda por la respiración aeróbica. Los problemas con la producción del ATP por la glucólisis son el uso rápido de la glucosa disponible de la fibra (la almacenada como glucógeno) y la producción de un producto final indeseable, el ácido láctico. Se considerará este último aspecto con mayor extensión.

Se debe recordar que la continuación de la glucólisis requiere de la regeneración del $NAD^+$, que ocurre por la fermentación (página 108). Las células musculares regeneran el $NAD^+$ al reducir el piruvato —el producto final de la glucólisis— a ácido láctico. La mayor parte del ácido láctico se difunde fuera de las células musculares activas hacia la sangre, donde se transporta del hígado, y se convierte de nuevo en glucosa. La glucosa producida en el hígado se libera a la sangre, donde se puede devolver a los músculos como sustancia activa para continuar como combustible de los altos niveles de la glucólisis. Sin embargo, la formación del ácido láctico se asocia con una caída del pH dentro del tejido muscular (desde aproximadamente un pH 7.00 a 6.35), que puede producir dolor y los calambres que acompañan al ejercicio intenso. El aumento de la acidez, junto con la acumulación del fosfato y los cambios conformacionales en la proteína miosina, contribuyen a la pérdida de la fuerza contráctil en los músculos durante el esfuerzo prolongado.

Si, en lugar de tratar de usar sus músculos para levantar peso o desarrollar carreras de velocidad, usted participara en un ejercicio aeróbico, como andar en bicicleta o caminar rápido, podría continuar desempeñando la actividad por periodos, sin sentir dolor muscular o fatiga. Los ejercicios aeróbicos, como su nombre lo indica, están diseñados para permitir que sus músculos continúen ejercitándose de forma aeróbica, es decir, continuar la producción de ATP necesaria por la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa. Los ejercicios aeróbicos dependen en gran medida de la contracción de las fibras de contracción lenta de los músculos esqueléticos. Aunque estas fibras generan menos fuerza, pueden continuar funcionando durante largos periodos debido a la producción aeróbica continua de ATP, sin producción del ácido láctico.

El ejercicio aeróbico es impulsado en un inicio por las moléculas de glucosa almacenadas como glucógeno en los mismos músculos, pero después de unos pocos minutos, los músculos dependen cada vez más de los ácidos grasos libres liberados en la sangre a partir del tejido adiposo (la grasa). Cuanto más prolongado sea el periodo de ejercicio, mayor será la dependencia de los ácidos grasos. Después de 20 minutos de ejercicio aeróbico intenso, se estima que casi 50% de las calorías que consumen los músculos se derivan de la grasa. El ejercicio aeróbico, como trotar, caminar rápido, nadar o montar en bicicleta es una de las mejores maneras de reducir contenido de grasa del cuerpo.

La relación de fibras de contracción rápida a fibras de contracción lenta varía de un músculo particular a otro. Por ejemplo, los músculos posturales de la espalda, que permiten a una persona estar de pie, están constituidos por una mayor proporción de fibras de contracción lenta, que los músculos del brazo usados para arrojar o levantar un objeto. La relación exacta de fibras de contracción rápida por fibras de contracción lenta en un músculo particular está determinada de forma genética y es bastante variable de persona a persona, permitiendo que un individuo en particular sobresalga en ciertos tipos de actividades físicas. Por ejemplo, los velocistas mundiales y levantadores de pesas tienden a tener una mayor proporción de fibras de contracción rápida en sus músculos que los corredores de larga distancia. Además, el entrenamiento para deportes como el levantamiento de pesas conduce a una desproporcionada ampliación de las fibras de contracción rápida.

El tejido muscular del corazón también debe incrementar su nivel de actividad durante el ejercicio intenso, pero a diferencia del tejido musculoesquelético, el corazón solo puede producir ATP por el metabolismo aeróbico. De hecho, cerca de 40% del espacio citoplasmático de una célula del músculo cardiaco humano está ocupada por las mitocondrias.

## 5.4 La fosforilación oxidativa en la formación de la ATP

Las mitocondrias se describen con frecuencia como plantas de energía en miniatura. Como las plantas de energía, las mitocondrias extraen energía de materiales orgánicos, y la almacenan temporalmente en forma de energía eléctrica. De forma más específica, la energía extraída de los sustratos se utiliza para generar un gradiente iónico a través de la membrana mitocondrial interna. Un gradiente iónico a través de una membrana representa una forma de energía, que puede ser aprovechada para realizar el trabajo. Se observó en el capítulo 4 que las células intestinales utilizan un gradiente iónico a través de su membrana plasmática para el transporte de los azúcares y aminoácidos fuera de la luz intestinal, igual que el nervio, las células emplean un gradiente similar para conducir los impulsos nerviosos. El uso de gradientes iónicos como una forma de moneda de energía requiere varios componentes, incluyendo un sistema para generar el gradiente, una membrana capaz de mantener el gradiente y la maquinaria para utilizar el gradiente para realizar trabajo.

Las mitocondrias utilizan un gradiente iónico a través de su membrana interna para conducir numerosas actividades que requieren energía, más notablemente la síntesis de ATP. Cuando la formación de ATP es impulsada por la energía que se libera de los electrones eliminados durante la oxidación del sustrato, el proceso se llama **fosforilación oxidativa** y se resume en la figura 5-10. La fosforilación oxidativa se puede contrastar con la fosforilación a nivel de sustrato, como se discute en la página 105, en la cual el ATP se forma directamente por la transferencia de un grupo fosfato de un sustrato molecular al ADP. Según una estimación, la fosforilación oxidativa cuenta para la producción de más de $2 \times 10^{26}$ moléculas (>60 kg) de ATP en nuestros cuerpos por día. Desentrañar el mecanismo básico de la fosforilación oxidativa ha sido uno de los logros cumbres en el campo de la biología celular y molecular; completar las lagunas restantes continúa siendo un

área activa de investigación. Para comprender el mecanismo de la fosforilación oxidativa, primero es necesario considerar cómo la oxidación del sustrato es capaz de liberar energía libre.

## Potenciales oxidación-reducción

Si uno compara una variedad de agentes oxidantes, se pueden clasificar en una serie según su afinidad por los electrones: cuanto mayor es la afinidad, más fuerte es el agente oxidante. Los agentes reductores también pueden clasificarse de acuerdo con su afinidad por los electrones: a menor afinidad (más fácilmente se liberan electrones), más fuerte es el agente reductor. Si asume esto en términos cuantificables, los agentes reductores se clasifican de acuerdo con el **potencial de transferencia de electrones**; esas sustancias que tienen un alto potencial de transferencia de electrones, como el NADH, son fuertes agentes reductores, mientras que aquellos con un bajo potencial de transferencia de electrones, como el $H_2O$, son débiles agentes reductores. Los agentes oxidantes y reductores se presentan como *parejas,* como $NAD^+$ y el NADH, que difieren en su cantidad de electrones. Los agentes reductores fuertes están emparejados a agentes oxidantes débiles, y viceversa. Por ejemplo, el $NAD^+$ (de la pareja $NAD^+$-NADH) es un agente oxidante débil, mientras que el $O_2$ (del par $O_2$-$H_2O$) es un agente oxidante fuerte.

Debido a que el movimiento de los electrones genera una separación de carga, la afinidad de las sustancias por los electrones se puede medir por instrumentos que detectan voltaje (**FIGURA 5-11**). Lo que se mide por una pareja dada es un **potencial de oxidación-reducción** (o **potencial redox**) relativo al potencial de una pareja estándar. La pareja estándar se ha elegido de forma arbitraria como el hidrógeno ($H^+$-$H_2$). Al igual que con los cambios de energía libre, donde se usó el estándar de variación de energía libre, ΔG°, una asignación similar se emplea para pares redox. El potencial de redox estándar, $E_0$, para un par determinado se designa como el voltaje producido por una semicelda (con solo miembros de un par presente) en el que cada miembro de la pareja está presente bajo condiciones estándar (como en la figura 5-11). Las condiciones estándar son 1.0 M para solutos y iones y presión de 1 atm para gases (p. ej., el $H_2$) a 25 °C. El potencial redox estándar para la reacción de oxidación-reducción que involucra el hidrógeno ($2H^+$ + 2 electrones → $H_2$) es 0.00 V. En la tabla 5-1 se brindan los potenciales redox de algunos pares biológicamente importantes. El valor para el par de hidrógeno en la tabla no es 0.00, sino −0.42 V. Este número representa el valor cuando la concentración de $H^+$ es $10^{-7}$ M (pH de 7.0) en lugar de 1.0 M (pH de 0.0), que sería de poco uso fisiológico. Cuando se calcula a pH 7, el potencial redox estándar está indicado por el símbolo $\Delta E'$, en lugar de $E_0$. La asignación de signo (positivo o negativo) para pares es arbitraria y varía entre diferentes disciplinas. Se considerará la asignación de la siguiente manera. Aquellos pares cuyos agentes reductores son mejores a los donantes de electrones se les asignan potenciales redox más negativos. Por ejemplo, el potencial redox estándar para el par $NAD^+$-NADH es 0.32 V (tabla 5-1). El acetaldehído es un agente reductor más fuerte que el NADH, y el par acetato-acetaldehído tiene un potencial redox estándar de −0.58 V. Esos pares cuyos agentes oxidantes son mejores receptores de electrones que el $NAD^+$, es decir, tienen mayor afinidad por electrones que el $NAD^+$ y potenciales redox más positivos.

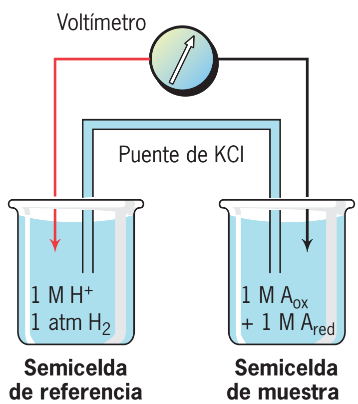



**FIGURA 5-11 La medición del potencial de oxidación-reducción (redox) estándar.** La semicelda de muestra contiene miembros oxidados y reducidos del par, ambos presentes en 1M. La semicelda de referencia contiene una solución 1M de $H^+$ que está en equilibrio con el gas de hidrógeno a una presión de 1 atm. Un circuito eléctrico se forma conectando las semiceldas a través de un voltímetro y un puente de sal. Si los electrones fluyen de forma preferente desde la semicelda de muestra a la semicelda de referencia, luego el potencial redox estándar ($E_0$) del par de muestra es negativo; si el flujo de electrones está en la dirección opuesta, el potencial redox estándar de la pareja de muestra es positivo. El puente de sal, que consiste en una solución saturada de KCl, proporciona una vía para que los contraiones se muevan entre las semiceldas y mantengan la neutralidad eléctrica en los dos compartimientos.

Al igual que cualquier otra reacción espontánea se acompaña de una pérdida de energía libre, también lo son las reacciones de oxidación-reducción. El cambio de energía libre estándar durante una reacción del tipo

$$A_{(ox)} + B_{(red)} \rightleftharpoons A_{(red)} + B_{(ox)}$$

se puede calcular a partir de los potenciales redox estándar de los dos pares involucrados en la reacción de acuerdo con la ecuación

$$\Delta G^{\circ\prime} = -\, nF\, \Delta E_0'$$

donde $n$ es el número de electrones transferidos en la reacción, $F$ es la constante de Faraday (23.063 kcal/V · mol), y $E_0'$ es la diferencia en voltios entre los potenciales redox estándar de los dos pares. Mientras mayor es la diferencia en el potencial redox estándar entre dos pares, más avanza la reacción en condiciones estándar para la formación de productos antes de alcanzar un estado de equilibrio. Se considera la reacción en la que NADH, un agente reductor fuerte, es oxidado por el oxígeno molecular, un fuerte agente oxidante.

$$NADH + \tfrac{1}{2}\, O_2 + H+ \rightarrow H_2O + NAD^+$$

Los potenciales redox estándar de los dos pares se pueden escribir como

$$\tfrac{1}{2}\, O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O \qquad E_0' = +\,0.82V$$

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADH + H^+ \qquad E_0' = -0.32V$$

**TABLA 5-1 Potenciales redox estándar de semirreacciones seleccionadas**

| Ecuación de electrodo | $E_0'$(V) |
|---|---|
| Succinato + $CO_2$ + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ alfacetoglutarato + $H_2O$ | −0.670 |
| Acetato + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ acetaldehído | −0.580 |
| 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ $H_2$ | −0.421 |
| Alfacetoglutarato + $CO_2$ + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ isocitrato | −0.380 |
| Cistina + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ 2 cisteína | −0.340 |
| $NAD^+$ + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ NADH + $H^+$ | −0.320 |
| $NADP^+$ + 2 $H^+$ + 2 $e^+$ ⇌ NADPH + $H^+$ | −0.324 |
| Acetaldehído + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ etanol | −0.197 |
| Piruvato + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ lactato | −0.185 |
| Oxaloacetato + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ malato | −0.166 |
| FAD + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ $FADH_2$ (en flavoproteínas) | +0.031 |
| Fumarato + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ succinato | +0.031 |
| Ubiquinona + 2 $H^+$ + 2 $e^-$ ⇌ ubiquinol | +0.045 |
| 2 citocromo $b_{(ox)}$ + 2 $e^-$ ⇌ 2 citocromo $b_{(red)}$ | +0.070 |
| 2 citocromo $c_{(ox)}$ + 2 $e^-$ ⇌ 2 citocromo $c_{(red)}$ | +0.254 |
| 2 citocromo $a_{3(ox)}$ + 2 $e^-$ ⇌ 2 citocromo $a_{3(red)}$ | +0.385 |
| $\frac{1}{2}O_2$ + $2H^+$ $2e^-$ ⇌ $H_2O$ | +0.816 |

El cambio de voltaje para la reacción total es igual a la diferencia entre los dos valores $E_0'$ ($\Delta E_0'$):

$$\Delta E_0' = +0.82 \text{ V} - (-0.32 \text{ V}) = 1.14 \text{ V}$$

que es una medida de la energía libre liberada cuando el NADH se oxida por el oxígeno molecular en condiciones estándar. Sustituyendo este valor en la ecuación anterior,

$$\Delta G°' = (-2)(23.\ 063 \text{ kcal/V} \cdot \text{mol})(1.14 \text{ V})$$

$$= -52.6 \text{ kcal/mol de NADH oxidado}$$

la variación de energía estándar libre ($\Delta G°'$) es de -52.6 kcal/mol. Como con otras reacciones, los valores de $\Delta G$ reales dependen de las relativas concentraciones de reactivos y productos (versiones oxidadas y reducidas de los compuestos) presentes en la célula en un instante dado. De forma independiente, parece que la caída en la energía libre de un par de electrones a medida que pasan del NADH al oxígeno molecular ($\Delta G°'$ = –52.6 kcal/mol) debería ser suficiente para conducir la formación de varias moléculas de ATP ($\Delta G°'$ = +7.3 kcal/mol) incluso bajo condiciones en la célula, donde las relaciones ATP/ADP son mucho más altas que aquellos en condiciones estándares. La transferencia de esta energía desde el NADH para el ATP dentro de la mitocondria se produce en una serie de pequeños pasos de energía liberada, que será el tópico principal de discusión en el resto del capítulo.

Los electrones se transfieren al $NAD^+$ (o FAD) dentro de la mitocondria de varios sustratos del ciclo del TCA, o sea, el isocitrato, el cetoglutarato, el malato y el succinato (las respectivas reacciones 14, 15-16, 19 y 17 de la figura 5-7). Los primeros tres de estos productos intermedios tienen potenciales redox de valores negativos relativamente altos (tabla 5-1), lo suficientemente altos para transferir electrones al $NAD^+$ en *condiciones que prevalecen en la célula*.[2] Por el contrario, la oxidación del succinato a fumarato, que tiene un potencial redox más positivo, procede por la reducción del FAD, una coenzima de mayor afinidad electrónica que el $NAD^+$.

## Transporte de electrones

Cinco de las nueve reacciones ilustradas en la figura 5-7 son catalizadas por deshidrogenasas, enzimas que transfieren pares de electrones de los sustratos a las coenzimas. Cuatro de estas reacciones generan NADH y uno produce $FADH_2$. Las moléculas NADH, que se forman en la matriz mitocondrial, se disocian de sus respectivas deshidrogenasas y se unen a NADH deshidrogenasa, una proteína integral de la membrana mitocondrial interna (véase figura 5-17). A diferencia de otras enzimas del ciclo de TCA, la succinato deshidrogenasa, la enzima que cataliza la formación del $FADH_2$ (figura 5-7, reacción 17), es un componente de la membrana mitocondrial interna. En cualquier caso, los electrones de alta energía asociados con NADH o $FADH_2$ son transferidos a través de una serie de transportadores de electrones específicos que constituyen la **cadena transportadora de electrones** (o **cadena respiratoria**) de la membrana mitocondrial interna.

[2] Como se indica en la tabla 5-1, el potencial redox estándar ($E´0$) del par oxaloacetato-malato es más positivo que el par $NAD^+$-NADH. Por tanto, la oxidación de malato a oxaloacetato tiene un efecto positivo $\Delta G°'$ (reacción 19, figura 5-7) y puede proceder a la formación de oxaloacetato solo cuando la relación de productos a reactivos se mantiene por debajo de las condiciones estándares. Los $\Delta\ G$ de esta reacción se mantiene negativa por mantenimiento de concentraciones de oxaloacetato muy bajas, lo cual es posible porque la siguiente reacción en el ciclo (reacción 12, figura 5-7) es muy exergónica y está catalizada por una de las principales enzimas controladoras de la velocidad del ciclo del TCA.

## Tipos de transportadores de electrones

La cadena transportadora de electrones contiene cinco tipos de transportadores de electrones unidos a la membrana: las flavoproteínas, los citocromos, los átomos de cobre, la ubiquinona, y las proteínas de hierro y azufre. Con la excepción de la ubiquinona, todos los centros redox dentro de la cadena respiratoria que aceptan y donan electrones son *grupos prostéticos*, es decir, componentes no aminoácidos que están estrechamente asociados con las proteínas.

- Las **flavoproteínas** consisten en un polipéptido unido a uno de los dos grupos prostéticos relacionados, el dinucleótido de adenina flavina (FAD, *flavin adenine dinucleotide*) o el mononucleótido de flavina (FMN, *flavin mononucleotide*) (**FIGURA 5-12*a***). Los grupos prostéticos de flavoproteínas se derivan de la riboflavina (vitamina $B_2$), y cada uno es capaz de aceptar y donar dos protones y dos electrones. Las principales flavoproteínas de las mitocondrias son la NADH deshidrogenasa de la cadena transportadora de electrones y la succinato deshidrogenasa del ciclo del TCA.
- Los **citocromos** son proteínas que contienen grupos prostéticos *hem* (como el descrito para la mioglobina en la página 56). El átomo de hierro de un hem experimenta una transición reversible entre el $Fe^{3+}$, y la oxidación de $Fe^{2+}$ se produce como resultado de la aceptación y la pérdida de un solo electrón (figura 5-12*b*). Existen tres citocromos distintos tipos —*a*, *b*, y *c*— presentes en la cadena transportadora de electrones, que difieren entre sí por sustituciones dentro del grupo hem (indicado por las partes sombreadas en azul de la figura 5-12*b*).
- Tres **átomos de cobre**, todos ubicados dentro de un solo complejo proteína de la membrana mitocondrial interna (véase figura 5-20), aceptan y donan un solo electrón, debido a que alternan entre los estados $Cu^{2+}$ y $Cu^{1+}$.
- **Ubiquinona** [(UQ, *ubiquinone*) o coenzima Q] es una molécula soluble en lípidos que contiene una larga cadena hidrofóbica compuesta de cinco unidades de carbonos isoprenoides (figura 5-12*c*). Al igual que las flavoproteínas, cada ubiquinona puede aceptar y donar dos electrones y dos protones. La molécula reducida de forma parcial es el radical libre ubisemiquinona, y la molécula completamente reducida es el ubiquinol ($UQH_2$). UQ/$UQH_2$ que permanece dentro de la bicapa lipídica de la membrana, donde es capaz de la difusión lateral rápida.
- Las **proteínas hierro-azufre** son proteínas que contienen hierro en las que los átomos de hierro no se localizan dentro de un grupo hem, sino que está vinculado a iones de sulfuro inorgánicos como parte de un *centro de hierro-azufre*. Los centros más comunes contienen dos o cuatro átomos de hierro y azufre —designados [2Fe-2S] y [4Fe- 4S]— vinculados a la proteína en los residuos de cisteína (**FIGURA 5-13**). Aunque un solo centro puede tener varios átomos de hierro, el complejo completo es capaz de aceptar y donar solo un electrón. El potencial redox de un centro de hierro y azufre depende de la hidrofobicidad y carga de los residuos de aminoácidos que componen su ambiente local. Como grupo, las proteínas de hierro y azufre tienen potenciales que van desde cerca de –700 mV hasta aproximadamente +300 mV correspondiente a una gran parte del lapso sobre el cual el transporte de electrones ocurre. Más de una docena de centros hierro y azufre distintos han sido identificados dentro de las mitocondrias.

Los transportadores de la cadena transportadora de electrones están dispuestos en orden del potencial redox cada vez más positivo (**FIGURA 5-14**). Cada transportador se reduce por la ganancia de electrones del portador anterior en la cadena y luego se oxida por la pérdida de electrones al siguiente portador. Por tanto, los electrones se pasan de un portador al siguiente, perdiendo energía

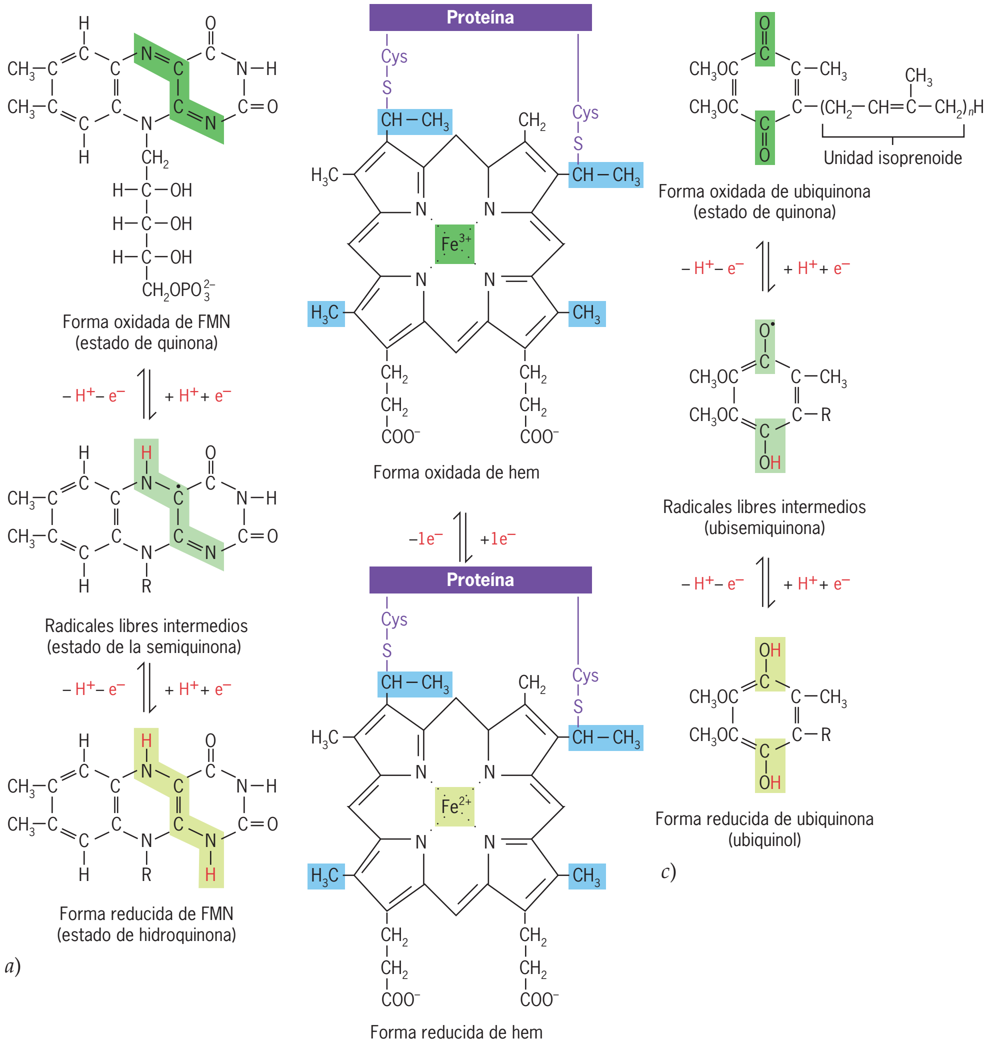



**FIGURA 5-12 Estructuras de formas oxidadas y reducidas de tres tipos de transportadores de electrones.** *a*) FMN de NADH deshidrogenasa, *b*) el grupo hem del citocromo *c*, y *c*) la ubiquinona (coenzima Q). Los grupos hem de varios citocromos de la cadena transportadora de electrones difieren en las sustituciones en los anillos de porfirina (indicado por el sombreado azul) y el tipo de enlace a la proteína. Los citocromos pueden aceptar solo uno electrón, mientras que el FMN y las quinonas pueden aceptar dos electrones y dos protones en reacciones sucesivas, como se muestra. El FAD difiere del FMN en que tiene un grupo de adenosina unido al fosfato.

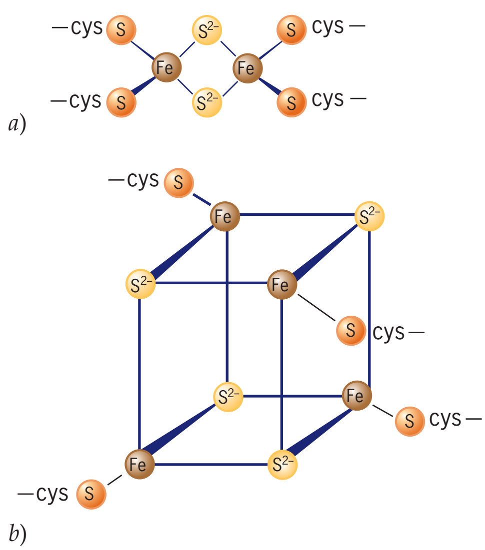



**FIGURA 5-13 Centros de hierro-azufre.** Estructura de un [2Fe-2*S*] *a*) y una [4Fe-4S] *b*) centro de hierro-azufre. Ambos tipos de centros de hierro y azufre se unen a la proteína por enlace a un átomo de azufre (se muestra en naranja) de un residuo de cisteína. Los iones de sulfuro inorgánicos ($S^{2-}$) se muestran en amarillo. Ambos tipos de centros de hierro-azufre aceptan solo un electrón, cuya carga se distribuye entre los diversos átomos de hierro.

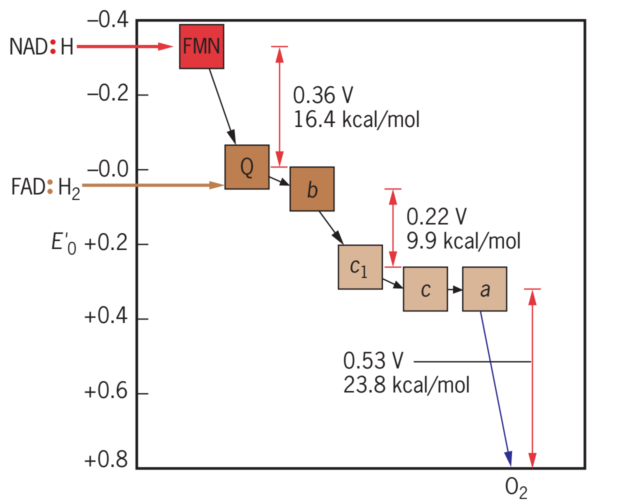



**FIGURA 5-14 La disposición de varios transportadores en la cadena transportadora de electrones.** En el diagrama se ilustra el potencial redox aproximado de los transportadores y la disminución de la energía libre como pares de electrones que se mueven a lo largo de la cadena respiratoria del oxígeno molecular. Los numerosos centros de hierro-azufre no están indicados en esta figura por simplicidad. Como se discute en la siguiente sección, cada una de las tres transferencias de electrones que se indican mediante las flechas rojas producen suficiente energía para mover protones a través de la membrana mitocondrial interna, que a su vez proporciona la energía necesaria para generar ATP desde ADP.

FUENTE: Basada en un dibujo de A. L. Lehninger. *Biochemistry* 1975; 2e.

mientras se mueven "cuesta abajo" a lo largo de la cadena. El último receptor de esta "cadena trasportadora" de electrones es el $O_2$, que acepta los electrones agotados de energía y se reduce a agua. La secuencia específica de transportadores que constituyen la cadena de electrones fue elaborado por Britton Chance y sus compañeros de trabajo en la Universidad de Pennsylvania, con el empleo de una variedad de inhibidores que bloquearon el transporte de electrones en sitios específicos a lo largo de la ruta. El concepto de estos experimentos se representa por analogía en **FIGURA 5-15**. En cada caso, se añadió un inhibidor a las células, y se determinó el estado de oxidación de varios transportadores de electrones en las células inhibidas. Esta determinación se puede hacer con el uso de un espectrofotómetro que mide la absorción de luz de una muestra en varias longitudes de onda. Esta medición revela si un portador en particular está en estado oxidado o reducido. En el caso representado en la figura 5-15, la adición de rotenona bloqueó el transporte de electrones en un sitio que dejó NADH y $FMNH_2$ en el estado reducido, y los citocromos izquierdos *b*, *c* y *a* en el estado oxidado. Este resultado indica que NAD y FMN están situados "cuesta arriba" del bloque. Por el contrario, un inhibidor (p. ej., la antimicina A) que actúa entre los citocromos *b* y *c* dejaría el NADH, el $FMNH_2$, el $QH_2$ y el citocromo *b* en estado reducido. Por tanto, al identificar los componentes reducidos y oxidados en presencia de diferentes inhibidores, las secuencias de los transportadores podrían ser determinadas.

La tendencia de los electrones a transferirse de un portador al siguiente depende de la diferencia del potencial entre los dos centros redox, pero la tasa de transferencia depende de las actividades catalíticas de las proteínas involucradas. Esta distinción entre la termodinámica y la cinética es similar a lo que se discute en la página 90 con respecto a la actividad de las enzimas. Los estudios indican que los electrones pueden viajar distancias considerables (10-20Å) entre centros redox adyacentes y que los electrones probablemente fluyan a través de "vías en túneles" especiales, que consisten en una serie de enlaces covalentes y de hidrógeno que se extienden a través de partes de varios residuos de aminoácidos. Un ejemplo de tal vía que implica el citocromo *c* se muestra en la **FIGURA 5-16**.

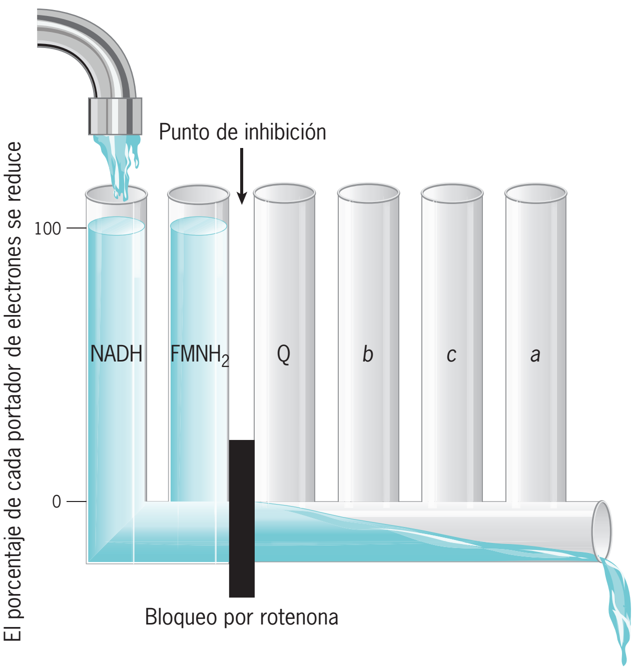



**FIGURA 5-15 El uso experimental de inhibidores para determinar la secuencia de los transportadores en la cadena transportadora de electrones.** En esta analogía hidráulica, el tratamiento de las mitocondrias con el inhibidor rotenona deja esos transportadores en la dirección de corriente arriba (NADH) del punto de inhibición en el estado reducido completo y aquellos transportadores en la dirección corriente abajo descendente ($O_2$) de la inhibición en el estado oxidado completo. La comparación de los efectos de varios inhibidores reveló el orden de los transportadores dentro de la cadena.

FUENTE: Basada en un dibujo de A. L. Lehninger. *Biochemistry* 1975;2e.

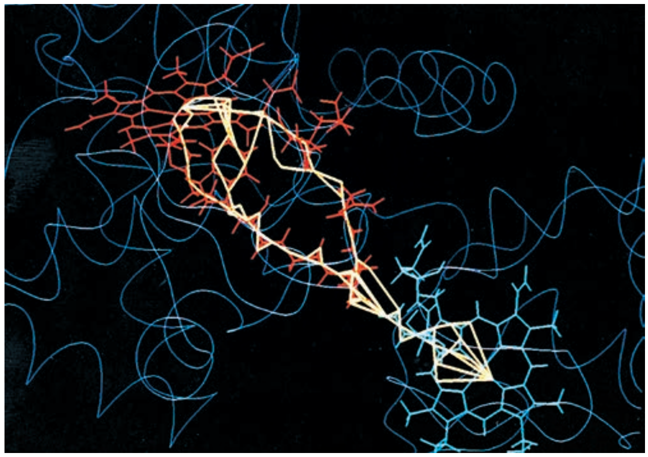


**FIGURA 5-16 Las vías de túneles de electrones para el citocromo *c* de levadura -complejo de citocromo *c* peroxidasa.** El grupo hem del citocromo *c* es azul, y el del citocromo *c* peroxidasa (que no es un portador de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, pero proporciona un electrón análogo receptor para el que están disponibles estructuras de cristal de alta resolución) es rojo. Varias vías definidas (amarillo) existen para el movimiento de electrones de un hem al otro. Cada una de las vías transporta los electrones a través de varios residuos de aminoácidos situados entre los grupos hem. (Se puede distinguir que se han propuesto otros mecanismos de transferencia de electrones).

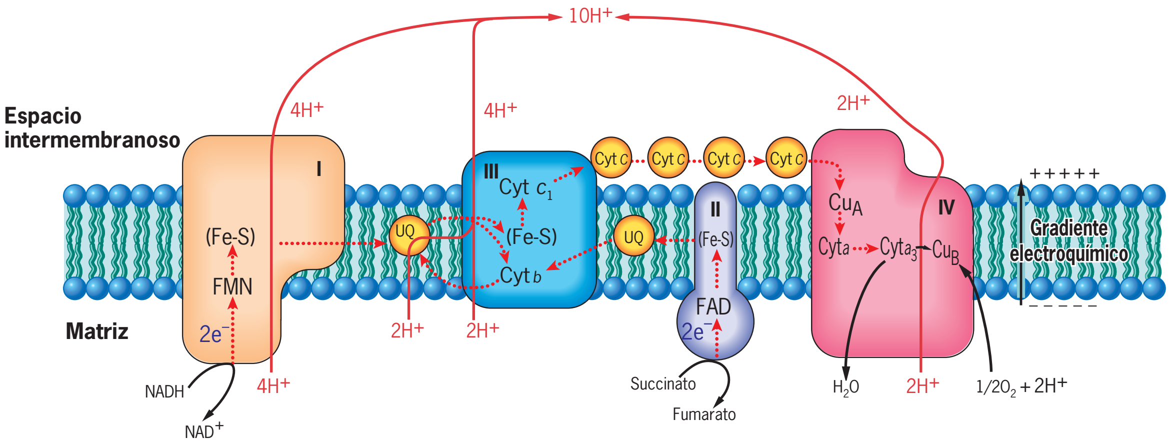
FUENTE: Por Jeffrey J. Regan y J. N. Onuchic, tomada de David N. Beratan, *et al*. *Science* 1992;258:1741. Reproducida con permiso de AAAS.

## REPASO

1. Describa los pasos por los cuales el transporte de electrones por la cadena respiratoria conduce a la formación de un gradiente de protones.
2. De los cinco tipos de transportadores de electrones, ¿cuál tiene una masa molecular más pequeña? ¿Cuál tiene la mayor proporción de átomos de hierro de los transportadores de electrones? ¿Cuál tiene un componente que se encuentra fuera de la bicapa lipídica? ¿Cuáles son capaces de aceptar protones y electrones, y cuáles solo electrones?
3. Describa la relación entre la afinidad de un compuesto por los electrones y su capacidad para actuar como un agente reductor. ¿Cuál es la relación entre el potencial de transferencia de electrones potencial de un agente reductor y la capacidad del otro miembro de su pareja para actuar como un agente oxidante?
4. Observe la figura 5-12 y describa cómo los estados de la semiquinona, la ubiquinona y la FMN son similares.

## 5.5 Complejos de transporte de electrones

Cuando la membrana mitocondrial interna se ve afectada por un detergente, los diversos transportadores de electrones se pueden aislar como parte de cuatro complejos de membrana distintos, asimétricos, identificados como complejos I, II, III y IV (**FIGURA 5-17**). Cada uno de estos cuatro complejos pueden ser asignados a una función distinta en la vía de oxidación global. Dos componentes de la cadena transportadora de electrones, el citocromo *c* y la ubiquinona no forman parte de ninguno de los cuatro complejos. La ubiquinona existe como un conjunto de moléculas di-




| Subunidades | Complejo I<br>NADH deshidrogenasa (mamífero) | Complejo III<br>Citocromo $bc_1$ | Complejo II<br>Succinato deshidrogenasa | Complejo IV<br>Citocromo *c* oxidasa |
|---|---|---|---|---|
| mtDNA codificado | 7 | 1 | 0 | 3 |
| nDNA codificado | 38 | 10 | 4 | 10 |
| TOTAL | 45 | 11 | 4 | 13 |
| Masa molecular (Da) | ~980 000 | ~240 000 | ~125 000 | ~200 000 |

**FIGURA 5-17 La cadena transportadora de electrones de la membrana mitocondrial interna.** La cadena respiratoria consta de cuatro complejos transportadores de electrones y otros dos transportadores (la ubiquinona y el citocromo *c*) que están dispuestos de forma independiente. Los electrones ingresan a la cadena desde NADH (a través del complejo I) o $FADH_2$ (una parte del complejo II). Los electrones pasan del complejo I o II a la ubiquinona (UQ), que existe como un conjunto dentro de la bicapa lipídica. Después los electrones pasan de la ubiquinona reducida (el ubiquinol) al complejo III, y luego a la proteína periférica citocromo *c*, la cual se piensa que es móvil. Los electrones se transfieren del citocromo *c* al complejo IV (la citocromo oxidasa) y luego al $O_2$ para formar el $H_2O$. Los sitios de translocación de protones de la matriz al citosol están indicados. La cantidad precisa de protones translocados en cada sitio sigue siendo controversial; el número indicado es un consenso general. Téngase en cuenta que la cantidad de protones que se muestran son los generados por cada par de electrones transportados, que es suficiente para reducir solo la mitad de una molécula de $O_2$. (La translocación de protones por el complejo III ocurre por medio de un ciclo Q, que es una serie de interconversiones secuenciales de la ubiquinona y el ubiquinol acoplado al movimiento de protones a través de la membrana. El ciclo Q se puede dividir en dos pasos, cada uno de los cuales conduce a la liberación de dos protones en el citosol).

sueltas en la bicapa lipídica, y el citocromo *c* es una proteína soluble en el espacio intermembranoso. Se cree que la ubiquinona y el citocromo *c* se mueven dentro o a lo largo de la membrana, mediante el transporte de electrones entre los complejos proteicos inmóviles relativamente grandes. Una vez dentro de uno de los grandes complejos de multiproteínas, los electrones viajan a lo largo de vías definidas (del tipo ilustrado en la figura 5-16) entre los centros redox adyacentes cuyas relativas posiciones están fijadas en el lugar.

Cuando NADH es el donador de electrones, los electrones ingresan a la cadena respiratoria por medio del complejo I, que transfiere electrones a la ubiquinona, generando el ubiquinol (figuras 5-12 y 5-17). A diferencia de NADH, que puede difundir lejos de sus deshidrogenasas solubles, $FADH_2$ permanece unido de forma covalente a la succinato deshidrogenasa, un componente de complejo II. Cuando $FADH_2$ es el donante, los electrones se pasan directamente a la ubiquinona, evitando el extremo superior de la cadena, que tiene potencial redox demasiado negativo para aceptar los electrones menos energéticos del nucleótido de flavina (figura 5-14).

Si se examinan los potenciales redox de los transportadores sucesivos en la figura 5-14, es evidente que existen tres lugares en los que la transferencia de electrones se acompaña de una liberación mayor de energía libre. Cada uno de estos *sitios de acoplamiento*, como se denominan, se produce entre los operadores que son parte de uno de los tres complejos, I, III y IV. La energía libre, que se libera cuando los electrones pasan a través de estos tres sitios, se conserva mediante la translocación de protones de la matriz al cruzar la membrana interna en el espacio intermembranoso. Estos tres complejos proteicos a menudo se describen como *bombas de protones*. A diferencia de otros iones (p. ej., el $Na^+$ o el $Cl^-$) que tienen que difundirse por sí mismos a través de toda la distancia atravesada, los iones $H^+$ pueden "saltar" a través de un canal intercambiándose con otros protones presentes a lo largo de la vía (como se ilustró en la figura 5-19*b*). Tales vías de conducción de protones (o "cables de protones") se pueden identificar porque consisten en cadenas de residuos ácidos, residuos unidos a hidrógeno y/o moléculas de agua atrapadas. La translocación de protones por estos tres complejos transportadores de electrones establecen el gradiente de protones que impulsa la síntesis de la ATP. La capacidad de estas notables máquinas moleculares para actuar como unidades de translocación de protones independientes puede ser demostrado con la purificación de cada uno de ellos e incorporándolos individualmente en vesículas de lípidos artificiales. Cuando se le otorga un apropiado donador de electrones, estas vesículas que contienen proteína son capaces de aceptar electrones y usar la energía liberada para bombear protones a través de la membrana de la vesícula (véase **FIGURA 5-18**).

En los últimos años se han logrado grandes avances para dilucidar la arquitectura molecular de todos los complejos proteicos de la membrana interna. Los investigadores al parecer ya no preguntan qué protegen estas proteínas, pero están usando la riqueza de la nueva información estructural para entender cómo funcionan. Se examinarán de manera breve versiones de mamíferos de cada uno de los cuatro complejos de transporte de electrones, que juntos contienen alrededor de 70 diferentes polipéptidos. Las versiones bacterianas son de manera considerable más simples que sus contrapartes de mamíferos, y contienen muchas menos

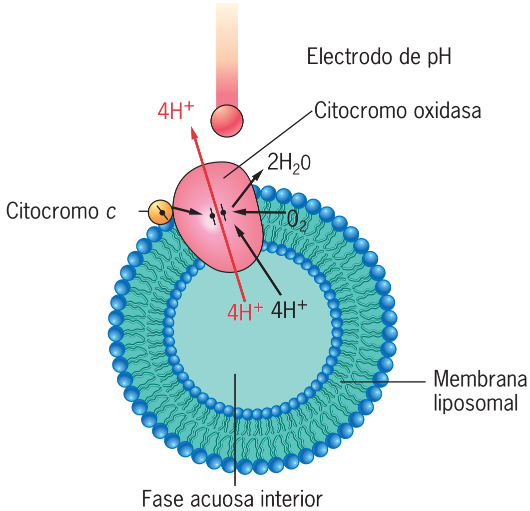



**FIGURA 5-18 La demostración experimental de que la citocromo oxidasa es una bomba de protones.** Cuando la citocromo oxidasa purificada se incorpora en la bicapa artificial de un liposoma, el medio se acidifica y sigue la adición del citocromo reducido c. Esto indica que como los electrones son transferidos del citocromo c a la citocromo oxidasa, y el $O_2$ está reducido a agua, los protones se están translocando del compartimiento dentro de la vesícula al medio externo. Este experimento fue originalmente llevado a cabo a finales de 1960 por Mårten Wikström y sus colegas en la Universidad de Helsinki en Finlandia.

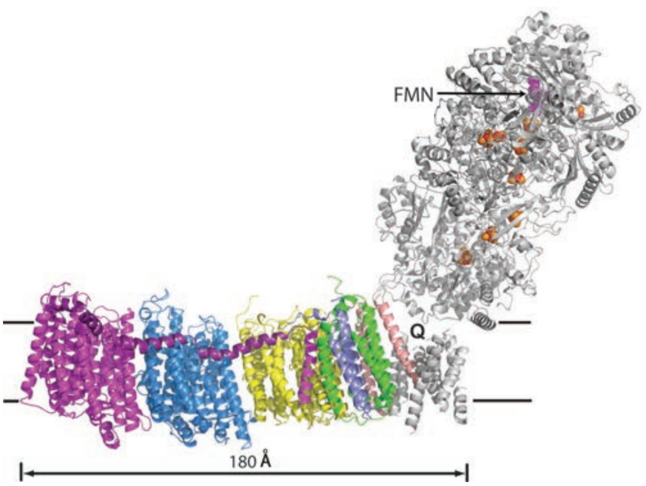
FUENTE: Reproducida con permiso de Macmillan Publishers Ltd: MI Verkhovsky, *et al*. *Nature* 1999;400:481, copyright 1999.

subunidades. Sin embargo, las subunidades adicionales de los complejos de mamíferos no contienen centros redox y se considera que funciona tanto en la regulación como en el ensamblaje del complejo en lugar del transporte de electrones. En otras palabras, el proceso básico del transporte de electrones durante la respiración se ha mantenido prácticamente sin cambios desde su evolución hace miles de millones de años en nuestros antepasados procarióticos.

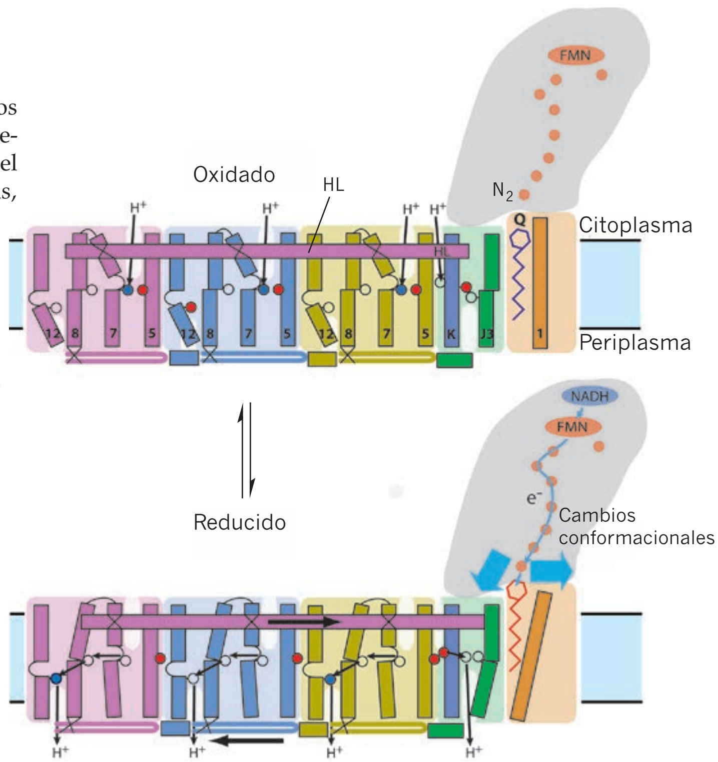
## Complejo I (NADH deshidrogenasa)

El complejo I es la puerta de acceso a la cadena transportadora de electrones, que cataliza la transferencia de un par de electrones de NADH a la ubiquinona (UQ) para formar el ubiquinol ($UQH_2$). La versión de mamífero del complejo I es un gran conglomerado en forma de L, que contiene 45 subunidades diferentes que constituyen una masa molecular masiva de casi un millón de daltons. Como se indica en la figura 5-19*a*), cerca de la mitad del complejo consiste en un dominio hidrofílico que se proyecta en la matriz, con el resto de la porción hidrofóbica del complejo incrustado en la membrana. Siete de las subunidades, todas hidrófobas, extensión de polipéptidos de membrana, están codificados por genes mitocondriales y son homólogos a los polipéptidos bacterianos. Juntos, los hidrófilos y las porciones del complejo integradas por la membrana, llevan a cabo las dos diferentes actividades que se requieren de la cadena transportadora de electrones: la transferencia de electrones y la translocación de protones.

Todos los componentes requeridos para la transferencia de electrones residen dentro de la porción hidrofílica del complejo (**FIGURA 5-19*b***). La cadena transportadora de electrones comien-




*a*)




*b*)

**FIGURA 5-19 Estructura y mecanismo de acción propuesto del complejo I de la cadena respiratoria.** *a*) Estructura cristalina de una forma bacteriana del complejo I. El dominio hidrofílico periférico y el dominio hidrofóbico incrustado en la membrana son evidentes. Los transportadores de electrones dentro del brazo periférico –o sea, FMN (la esfera magenta), los siete centros Fe-S (las esferas rojas) y el sitio de unión de la quinona (Q) están indicados—. La hélice HL del dominio de la membrana, que se propone que actúe como una varilla o pistón, se observa que corre casi en paralelo al plano de la membrana. *b*) el mecanismo propuesto por el cual la transferencia de electrones en el brazo hidrófilo periférico está acoplada por cambios conformacionales a la translocación de protones a través del dominio de la membrana. La reducción de ubiquinona en el sitio Q conduce a un movimiento hacia la derecha de la hélice HL (indicado por la flecha negra superior en la versión reducida), lo que causa cambios conformacionales en las hélices transmembrana, que conducen al movimiento de protones a través de la membrana. Los residuos cruciales cargados en subunidades del dominio de membrana están indicados por los círculos. Los círculos rojos representan residuos del ácido glutámico no protonado, y los círculos azules representan los residuos de lisina protonada. Las formas protonadas y no protonadas de estos residuos se pueden distinguir como círculos vacíos, respectivamente. El movimiento de protones entre estos residuos, que es impulsado por los cambios conformacionales en las hélices transmembrana, forma la base para la translocación de los protones.

FUENTE: De Rouslan G. Efremov y Leonid A. Sazanov. *Nature* 2011;476:414; reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

za con un FMN que contiene a la flavoproteína, la cual oxida al NADH en la extremidad del complejo gigante. Los electrones se transfieren luego a través de siete centros hierro y azufre distintos dentro del cuerpo del dominio hidrofílico, que termina con la transferencia de electrones a una molécula de ubiquinona unida a la proteína situada cerca del límite de la membrana. (Un octavo grupo de Fe-S y tal vez una segunda molécula de quinona también están presentes, pero aparentemente no en la vía directa de la transferencia de electrones). El paso de un par de electrones de NADH a la ubiquinona se piensa que se acompaña del movimiento de cuatro protones desde la matriz hacia el espacio intermembranoso. La determinación de la estructura del complejo I (figura 5-19*a*) ha contribuido a una propuesta que explica cómo el transporte de electrones a través del brazo periférico del complejo puede conducir a la translocación de protones a través de la porción integrada a la membrana distante. Puede ser observado en la figura 5-19*b*) que el dominio integrado a la membrana del complejo contiene una hélice muy larga, denotada HL (se muestra en púrpura), que está orientado aproximadamente en paralelo a la superficie de la membrana. Esta hélice, la cual se extiende casi a lo largo del dominio de la membrana, está en contacto directo con tres hélices transmembrana discontinuas (se muestran en morado, azul y verde olivo). Cada una de las hélices discontinuas es parte de un medio canal. Cada par de medios canales está conectado por una red de cadenas laterales de aminoácidos polares para proporcionar una canal potencial completo para la translocación de protones a través de la membrana. Existe la probabilidad de que un cuarto canal de conducción de protones esté ubicado cerca de la interfaz con el dominio soluble como se muestra en la figura 5-19*b*). Se propone que el movimiento de electrones a la ubiquinona induce un cambio conformacional en el complejo que causa el movimiento lateral de la hélice HL (hacia la derecha en la figura 5-19*b*). Esto a su vez conduce al movimiento de inclinación de las hélices transmembrana, que cambia el ambiente iónico de ciertos residuos de transferencia de protones, que conducen al movimiento de protones a través de la membrana (flechas negras hacia abajo). Los autores de esta propuesta comparan el mecanismo de acción del complejo I a la de una máquina de vapor, con hélice HL, que actúa como el pistón que impulsa el movimiento corriente abajo de los elementos de la maquinaria.

Se puede observar que la disfunción del complejo I se ha relacionado con ciertos trastornos neurodegenerativos, como se discute en la "Perspectiva humana" en la página 195.

## Complejo II (succinato deshidrogenasa)

El complejo II consiste en cuatro polipéptidos: dos subunidades hidrofóbicas que anclan la proteína en la membrana y dos subunidades hidrófilas que comprenden la enzima del ciclo de TCA, la succinato deshidrogenasa. El complejo II proporciona una vía para alimentar electrones de baja energía (unos cerca de 0 mV) de succinato a FAD a ubiquinona (figuras 5-14 y 5-17). La vía desde la $FADH_2$ en el sitio catalítico de la enzima hasta la ubiquinona toma los electrones a una distancia de 40 Å a través de tres grupos hierro-azufre. El complejo II también contiene un grupo hem, que se cree atrae electrones escapados, impidiendo la formación de radicales superóxidos destructivos (página 34). La transferencia de electrones a través del complejo II no está acompañado por la translocación de protones.

## Complejo III (citocromo $bc_1$)

El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo *c*. Las determinaciones experimentales sugieren que cuatro protones se translocan a través de la membrana por cada par de electrones transferido a través del complejo III. Los protones se liberan en el espacio intermembranoso en dos pasos separados impulsados por la energía liberada como un par de electrones que están separados el uno del otro, y pasaron por diferentes vías a través del complejo. Dos protones se derivan de la molécula del ubiquinol que entró en el complejo. Dos protones adicionales se eliminan de la matriz y se transfieren a través de la membrana como parte de una segunda molécula del ubiquinol. Tres de las subunidades del complejo III contienen grupos redox: el citocromo *b* contiene dos moléculas de hem *b* con diferentes potenciales redox, el citocromo $c_1$ y una proteína de hierro y azufre. El citocromo *b* es el único polipéptido del complejo codificado por un gen mitocondrial.

## Complejo IV (citocromo *c* oxidasa)

El paso final del transporte de electrones en una mitocondria es la transferencia de electrones sucesiva desde el citocromo *c* reducido al oxígeno de acuerdo a la reacción

$$2 \text{ cit } c^{2+} + 2 \text{ H}^+ + \tfrac{1}{2} \text{ O}_2 \rightarrow \text{cit } c^{3+} + \text{H}_2\text{O}$$

Para reducir una molécula completa de $O_2$,

$$4 \text{ cit } c^{2+} + 4 \text{ H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cit } c^{3} + 2 \text{ H}_2\text{O}$$

La reducción de $O_2$ es catalizada por el complejo IV, un gran conjunto de polipéptidos conocidos como **citocromo oxidasa**. Este fue el primer componente de la cadena transportadora de electrones demostrado que actúa como una bomba de protones dirigida por el redox. Ello fue demostrado en el experimento representado en la figura 5-18, la enzima purificada se incorporó en vesículas que contienen un bicapa lipídica artificial (los liposomas). La adición de citocromo *c* reducido al medio fue acompañado por la expulsión de los iones $H^+$ de las vesículas, que se midió como una caída en el pH circundante. Ya sea dentro de un liposoma o en la membrana mitocondrial interna, la translocación de protones se acopla a los cambios conformacionales generados por la liberación de energía que acompaña a la transferencia de electrones. Por cada molécula de $O_2$ reducida por la citocromo oxidasa, ocho protones se consideran que se toman de la matriz. Cuatro de estos protones son consumidos en la formación de dos moléculas de agua como se indica arriba, y los otros cuatro protones se translocan a través de la membrana y se liberan en el espacio intermembranoso (figura 5-17). En consecuencia, la reacción general puede escribirse:

$$4 \text{ cit } c^{2+} + 8 \text{ H}^+_{\text{matriz}} + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cit } c^{3+} \; 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+_{\text{citosol}}$$

Los seres humanos producen alrededor de 300 mL de "agua metabólica" a partir de esta reacción por día. Se puede observar que un número de potentes venenos respiratorios, incluyendo el monóxido de carbono (CO), el azida ($N_3^-$) y el cianuro ($CN^-$), tienen efecto tóxico uniéndose al sitio hem $a_3$ de la citocromo oxidasa. (El monóxido de carbono también se une al grupo hem de la hemoglobina).

La citocromo oxidasa consta de 13 subunidades, tres de las cuales son codificadas por el genoma mitocondrial y contienen los cuatro centros redox de proteínas. Un gran desafío para los investigadores es explicar cómo los transportadores que solo pueden portar electrones individuales pueden reducir una molécula de $O_2$ a dos moléculas de $H_2O$, un proceso que requiere de cuatro electrones (junto con cuatro protones). De mayor importancia, es que el proceso debe ocurrir de forma muy eficiente porque la célula está con sustancias muy peligrosas; la liberación "accidental" de las especies de oxígeno reducidas de forma parcial tiene el

potencial de dañar de manera virtual cada macromolécula en la célula (página 34).

El movimiento de electrones entre los centros redox de la citocromo oxidasa se muestra en la **FIGURA 5-20**. Los electrones se transfieren uno a la vez desde el citocromo *c* a través de un centro de cobre bimetálico (CuA) de subunidad II a un hem (hem *a*) de la subunidad I. A partir de ahí, los electrones son pasados a un centro redox localizado en la subunidad I que contiene un segundo hem (hem $a_3$) y otro átomo de cobre ($Cu_B$) situado a menos de 5 Å. La aceptación de los dos primeros electrones reduce el centro binuclear $a_3$-$Cu_B$ según la reacción

$$Fe_{a_3}^{3+} + Cu_B^{2+} + 2e\text{-} \rightarrow Fe_{a_3}^{2+} + Cu_B^{1+}$$

Una vez que el centro binuclear acepta su segundo electrón, una molécula de $O_2$ se une al centro. Entonces, el doble enlace O═O se rompe como los átomos de O aceptan un par de electrones del centro binuclear reducido $a_3$-$Cu_B$, probablemente formando un anión peroxi reactivo $O_2^{2-}$.

$$Fe^{2+}\text{—}O{=}O\ Cu^{1+} \rightarrow Fe^{3+}\text{—}O^{-}\text{—}O^{-}\ Cu^{2+}$$

En pasos posteriores, el centro binuclear acepta dos electrones más del citocromo *c* y cuatro protones de la matriz, que conduce a la formación de dos moléculas de agua. Por cada protón eliminado de la matriz, un exceso de carga negativa (en forma de $OH^-$) queda atrás, lo que contribuye de forma directa al gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna.

Como se señaló antes, los protones tomados de la matriz se utilizan en dos vertientes muy diferentes. Por cada molécula de $O_2$ reducida a $2H_2O$ por la citocromo oxidasa: 1) se consumen cuatro iones $H^+$ en esta reacción química y 2) cuatro iones $H^+$ adicionales se traslocan a través de la membrana mitocondrial interna. Los primeros cuatro protones pueden ser denominados como protones "sustratos" y los cuatro últimos como protones "bombeados". El movimiento de ambos grupos de protones contribuye al gradiente electroquímico a través de la membrana.

Con la publicación de la estructura tridimensional de cristal de la citocromo oxidasa, se hizo posible buscar vías a través de las cuales el sustrato y los protones bombeados pueden moverse a través de la gran estructura proteica. Los investigadores han identificado posibles conductos de protones dentro de la molécula, pero su función no ha sido establecida de forma experimental. Desafortunadamente, los modelos estructurales estáticos, por sí mismos, no pueden revelar los movimientos dinámicos que tienen lugar dentro de las funciones de la proteína. La energía liberada por la reducción de $O_2$ es probable que sea utilizada para impulsar los cambios conformacionales que alteran los estados de ionización y las ubicaciones precisas de las cadenas laterales de aminoácidos dentro estos canales. Estos cambios, a su vez, promoverían el movimiento de iones $H^+$ a través de la proteína, como ocurre durante el transporte de electrones en el complejo I (figura 5-19*b*).

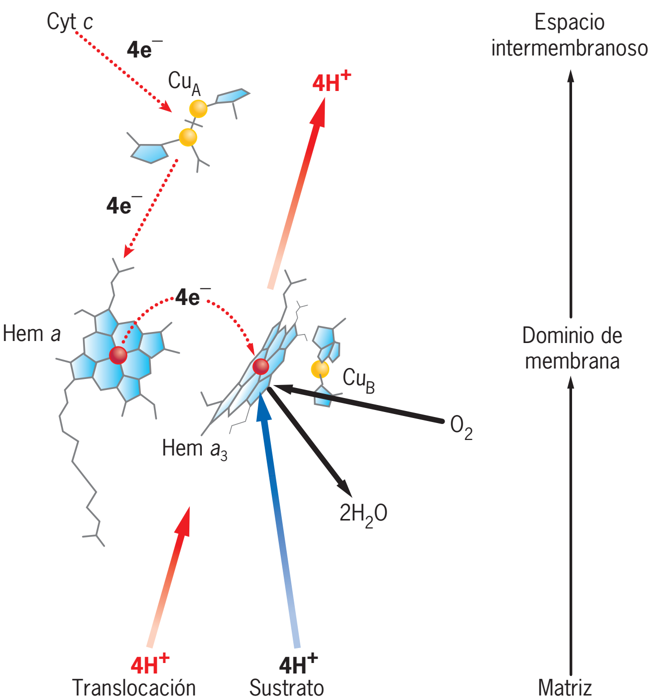



**FIGURA 5-20 Resumen de la actividad de la citocromo oxidasa.** Un modelo muestra el flujo de electrones a través de los cuatro centros redox de la citocromo oxidasa. Los átomos de hierro se exponen como esferas rojas, los átomos de cobre como esferas amarillas. Se cree que los electrones pasan uno a la vez desde el citocromo c al centro del cobre dimérico ($Cu_A$), luego al hierro del grupo hem del citocromo *a*, y más tarde al centro redox binuclear que consiste en un segundo hierro (del grupo hem del citocromo $a_3$) y ion de cobre ($Cu_B$). Se indican las estructuras y orientaciones sugeridas de los centros redox.

FUENTE: Reimpresa de M. Wikstrom, *et al. Biochim Biophysics* ACTA 2000;1459:515, con permiso de Elsevier.

**REPASO**

1. ¿Qué significa el centro binuclear de la citocromo oxidasa? ¿Cómo funciona en la reducción del $O_2$?
2. ¿Cuáles son dos formas diferentes en que la citocromo oxidasa contribuye al gradiente de protones?
3. ¿Por qué algunas transferencias de electrones provocan una mayor liberación de energía que otras transferencias?

## 5.6 Establecimiento de una fuerza protón motriz

Hemos visto que la energía libre que se libera durante el transporte de electrones se utiliza para mover protones desde la matriz al espacio intermembranoso y el citosol. La translocación de protones a través de la membrana interna es electrogénica (es decir, produce voltaje) porque da como resultado un mayor número de cargas positivas en el espacio intermembranoso y en el citosol, y un mayor número de cargas negativas dentro de la matriz. Por tanto, hay dos componentes del gradiente de protones a considerar. Uno de los componentes es la diferencia de concentración entre iones de hidrógeno en un lado de la membrana frente al otro lado; esto es un gradiente de pH (**ΔpH**). El otro componente es el voltaje (*c*) que resulta de la separación de carga a través de la membrana. Un gradiente que tiene una concentración (química) y un componente eléctrico (voltaje) es un *gradiente electroquímico* (página 140). La energía presente en ambos componentes del gradiente electroquímico de protón se puede combinar y expresar como **fuerza protón motriz (Δp)**, que se mide en milivoltios. Así,

$$\Delta p = \psi - 2.3\ (RT/F)\ \Delta pH$$

Debido a que 2.3 $RT/F$ es igual a 59 mV a 25 °C, la ecuación[3] puede ser reescrita como

$$\Delta P = \psi - 59\ \Delta pH$$

La contribución a la fuerza motriz protónica hecha por el potencial eléctrico *versus* el gradiente de pH depende de las propiedades de permeabilidad de la membrana interna. Por ejemplo, si el movimiento hacia afuera de protones durante el transporte de electrones se acompaña de iones de cloruro cargados negativamente, entonces el potencial eléctrico (ψ) se reduce sin afectar el gradiente de protones ΔpH. Mediciones hechas en varios laboratorios sugieren que las mitocondrias que respiran de forma activa generan una fuerza motriz protónica de casi 220 mV a través de su membrana interna. En las mitocondrias de los mamíferos, casi 80% de la energía libre de Δp está representado por el componente de voltaje y el otro 20% por la diferencia de concentración de protones (aproximadamente de 0.5 por 1 unidad de pH de diferencia). Si la diferencia de concentración de protones fuera mucho mayor que esto, quizás afectaría la actividad de las enzimas citoplásmicas. El voltaje a través de la membrana mitocondrial interna se puede visualizar mediante el uso de colorantes solubles en lípidos cargados de forma positiva que se distribuyen a través de las membranas en proporción al potencial eléctrico (**FIGURA 5-21**).

La fuerza motriz del protón describe la energía total que es liberada cuando un protón se mueve hacia abajo del gradiente, expresado como potencial eléctrico en unidades de voltios. Es fácil convertir la fuerza motriz del protón en unidades más familiares de energía libre. Para hacer esto, recuerde en la página 140 que la energía para mover un ion a través de un potencial de voltaje Δp es

$$\Delta G = zF\Delta p$$

pero para un protón, z = 1 debido a que tiene una sola carga positiva. Entonces si conocemos la fuerza motriz del protón Δp, siempre podemos hallar la energía libre

$$\Delta G = F\ \Delta p$$

donde F = 23.06 kcal/mol • V

[3] En otras palabras, una diferencia de una unidad de pH, que representa una diferencia de 10 veces en la concentración de $H^+$ a través de la membrana es equivalente a una diferencia de potencial de 59 milivoltios, que es equivalente a una diferencia de energía libre de 1.37 kcal/mol.

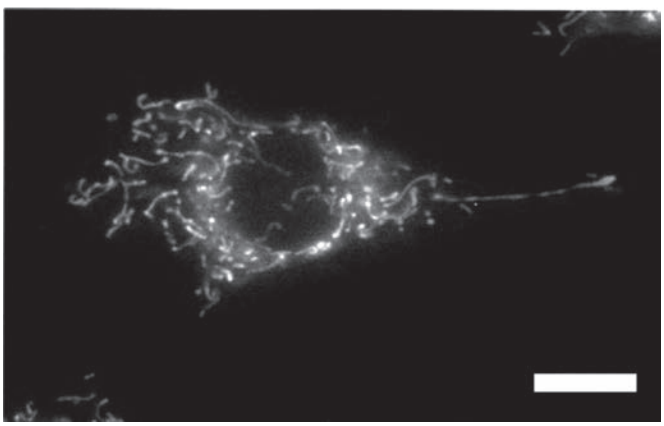


**FIGURA 5-21 Visualización de la fuerza protón motriz.** Micrografía de fluorescencia de una célula cultivada teñida con un colorante fluorescente conocido como JC-1, cuya emisión de fluorescencia cambia de verde a naranja cuando el potencial de membrana de la mitocondria aumenta.

FUENTE: Ivan S. Chernoivanenko, *et al. FASEB J* 2015;29:820-827. Panel B, fig. 4.

Cuando las células se tratan con ciertos agentes solubles en lípidos, principalmente con 2,4-dinitrofenol (DNP, *dinitrophenol*), continúan oxidando sustratos sin poder generar ATP. En otras palabras, el DNP *desacopla* la oxidación de la glucosa y la fosforilación de ADP. Debido a esta propiedad, el DNP se ha utilizado con frecuencia en el laboratorio para inhibir la formación de ATP. Durante la década de 1920, algunos médicos incluso recetaron DNP como píldora de dieta. Cuando se expusieron al fármaco, las células de pacientes obesos continuaron oxidando sus reservas de grasa en un intento vano de mantener niveles normales de ATP. La práctica cesó con la muerte de varios pacientes que tomaban el medicamento. Con la formulación de la teoría quimiosmótica y la determinación de que las mitocondrias generan un gradiente de protones, el mecanismo de acción del DNP llegó a ser comprendido. Este medicamento puede desacoplar la oxidación y la fosforilación porque se combina con protones y, debido a su solubilidad en lípidos, transporta a los protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia abajo de su gradiente electroquímico.

El mantenimiento de una fuerza motriz de protones requiere que en el interior la membrana mitocondrial siga siendo bastante impermeable a los protones. Si no, el gradiente establecido por el transporte de electrones se disipa con rapidez por el movimiento de protones de vuelta a la matriz, lo que lleva a la liberación de energía como calor. Fue una sorpresa descubrir que la membrana mitocondrial interna de ciertas células contiene proteínas transportadoras de protones, llamadas *proteínas desacopladoras* (o UCP, *uncoupling proteins*), que actúan como desacopladores naturales (endógenos). Una de estas proteínas, la UCP1, es especialmente abundante en el tejido adiposo marrón de los mamíferos, que funciona como fuente de producción de calor durante la exposición a temperaturas frías. Los bebés humanos también dependen de la "quema" de los depósitos de grasa marrón para mantener la temperatura corporal. Se pensó hasta hace poco que los humanos adultos carecían en gran parte de tejido adiposo marrón, pero varios estudios recientes han demostrado la presencia de células grasas marrones en el cuello y parte superior del tórax. Como en los bebés, estas células se activan cuando están expuestos a temperaturas frías. Otras isoformas de UCP (UCP2-UCP5) están presentes en una variedad de tejidos, fundamentalmente en las células del sistema nervioso, pero sus funciones son debatidas. Por ejemplo, la UCP en la membrana mitocondrial interna se cree que previene la acumulación de una fuerza motriz de protones muy grandes. Si tal estado de energía tan alto se formara, podría bloquear el paso de electrones a través de los complejos respiratorios, lo que conduce a la fuga de electrones y la producción de radicales reactivos de oxígeno.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son los dos componentes de la fuerza motriz del protón, y cómo puede variar su contribución relativa de una célula a otra?
2. ¿Cuál es el efecto del dinitrofenol en la formación de ATP por las mitocondrias? ¿Por qué es este el caso?

## 5.7 La estructura de la ATP sintasa

Ahora que se ha percibido cómo el transporte de electrones genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, se puede recurrir a la maquinaria molecular que utiliza la energía almacenada en este gradiente para impulsar la fosforilación de ADP.

A principios de la década de 1960, Humberto Fernandez-Moran del Hospital General de Massachusetts estuvo examinando mitocondrias aisladas por la técnica recientemente desarrollada de tinción negativa. Fernandez-Moran descubrió una capa de esferas unidas al lado interno (matriz) de la membrana interna, proyectándose desde la membrana y unido a él por tallos (**FIGURA 5-22**). Unos años más tarde, Efraim Racker de la Universidad de Cornell aisló las esferas de la membrana interna, que llamó *factor de acoplamiento 1*, o simplemente $F_1$. Racker descubrió que las esferas $F_1$ se comportaban como una enzima que hidrolizaba el ATP, es decir, una ATPasa. A primera vista, parece ser un hallazgo peculiar. ¿Por qué las mitocondrias poseen una enzima predominante que hidroliza la sustancia que se supone que debe producir?

Si se considera que la hidrólisis del ATP es la reacción inversa de su formación, la función de la esfera $F_1$ se vuelve más evidente; contiene el sitio catalítico en el cual se forma el ATP. Usted debe recordar que

3. Las enzimas no afectan la constante de equilibrio de la reacción que ellos catalizan.
4. Las enzimas son capaces de catalizar reacciones tanto hacia adelante como hacia atrás.

En consecuencia, la dirección de una reacción catalizada por una enzima en cualquier tiempo dado depende de las condiciones prevalecientes. Esto está bien mostrado en experimentos con otras ATPasas, como la $Na^+/K^+$-ATPasa de la membrana plasmática (página 153). Cuando esta enzima fue discutida en el capítulo 4, fue descrita como una enzima que utilizaba la energía obtenida de la hidrólisis del ATP para exportar $Na^+$ e importar $K^+$ en contra de sus respectivos gradientes. En la célula esta es la única función de la enzima. Sin embargo, bajo condiciones experimentales, esta enzima puede catalizar la formación de ATP en lugar de su hidrólisis (**FIGURA 5-23**). Para obtener tales condiciones, los glóbulos rojos fantasmas (página 137) están preparados con una concentración de $K^+$ interna *muy alta* y una concentración externa de $Na^+$ *muy alta*, más alta de lo que normalmente existe en el cuerpo. En estas condiciones, el $K^+$ se mueve fuera de la "célula"

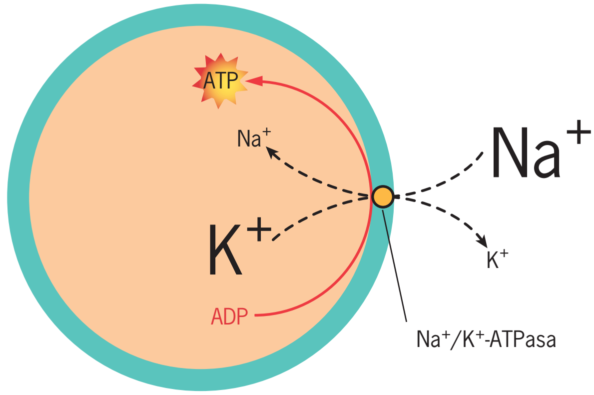



**FIGURA 5-23 Un experimento para impulsar la formación de ATP en vesículas de membrana reconstituidas con $Na^+/K^+$- ATPasa.** Al causar estas vesículas una concentración interna de $K^+$ muy alta y una concentración externa de $Na^+$ muy alta, la reacción se hizo correr en dirección opuesta a la de su curso normal en la membrana plasmática. En el proceso, se forma ATP a partir de ADP y $P_i$. El tamaño de las letras indica la dirección de los gradientes de concentración.

y el $Na^+$ se mueve hacia dentro de la "célula". Ambos iones se mueven hacia debajo de los gradientes respectivos, más que en contra de ellos como lo harían de forma regular en una célula viviente. Si el ADP y $P_i$ están presentes dentro del fantasma, el movimiento de los iones provoca que se sintetice ATP en lugar de ser hidrolizado. Experimentos como este ilustran la realidad de lo que se esperaría sobre la base de la reversibilidad teórica de reacciones catalizadas por enzimas. También ilustran cómo un gradiente iónico puede usarse para generar una reacción en la cual el ADP se fosforila a ATP, que es precisamente lo que ocurre en la mitocondria. La fuerza impulsora es la fuerza motriz del protón establecida por el transporte de electrones. Aunque la esfera $F_1$ es la porción catalítica de la enzima que fabrica ATP en la mitocondria, no es esa toda la historia. La enzima sintetizadora de ATP, que se llama **ATP sintasa**, es un complejo proteico en forma de hongo (**FIGURA 5-24*a***) formada por dos componentes principales: una cabeza $F_1$ esférica (alrededor de 90 Å de diámetro) y una sección basal, llamada $F_o$, incrustada en la membrana interna. La "o" en $F_o$ no es un cero, sino la letra "o", que significa "oligomicina", una toxina que funciona uniéndose a la subunidad $F_o$. Las micrografías electrónicas de alta resolución indican que las dos partes están conectadas por un tallo central y uno periférico, como se muestra en la figura 5-24*b*). Una típica mitocondria del hígado de un mamífero tiene casi 15 000 copias de ATP sintasa. Se encuentran versiones homólogas de la ATP sintasa en la membrana plasmática de las bacterias, en la membrana tilacoide de plantas cloroplásticas y en la membrana interna de las mitocondrias. Las porciones $F_1$ de las ATP sintasas bacterianas y mitocondriales están muy conservadas; ambas contienen cinco diferentes polipéptidos con una composición de $\alpha_3\beta_3\,\delta\gamma\varepsilon$. Las subunidades $\alpha$ y $\beta$ están dispuestas de forma alternativa dentro de la cabeza $F_1$ de una manera que se asemeja a los segmentos de una naranja [figura 5-24*a*), véase también 5-26*b*)]. Se pueden señalar dos aspectos para la discusión posterior: 1) cada $F_1$ contiene tres sitios catalíticos para la síntesis de ATP, uno en cada subunidad $\beta$, y 2) la subunidad $\gamma$ se mueve desde la punta externa de la cabeza $F_1$ a través del tallo central y hace contacto con la base de $F_o$. En la enzima mitocondrial, los cinco polipéptidos de $F_1$ están codificados por el DNA nuclear, se sintetizan en el citosol, y luego se importan (véase figura 8-47).

La parte $F_o$ de la ATP sintasa reside dentro de la membrana y consta de tres polipéptidos diferentes con una estequiometría de $ab_2c_{10}$ en la *E. coli* (figura 5-24*b*). La cantidad de subunidades en el anillo *c* puede variar en dependencia de la fuente de la enzima. Tanto en la ATP sintasa mitocondrial de la levadura y la *E. coli*,

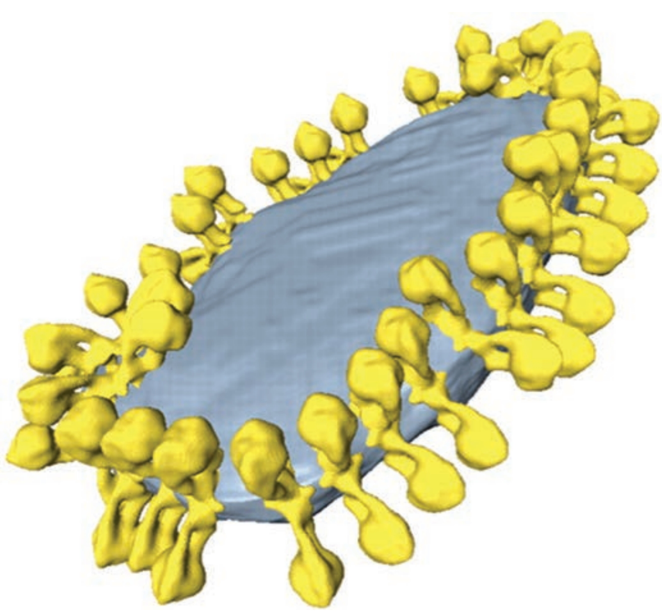


**FIGURA 5-22 La maquinaria para la síntesis de ATP.** La micrografía tridimensional electrónica de membranas mitocondriales aisladas que muestra partículas esféricas unidas por tallos delgados.

FUENTE: De Davies K. M., *et al. PNAS* 109:13602-13607, 2012.

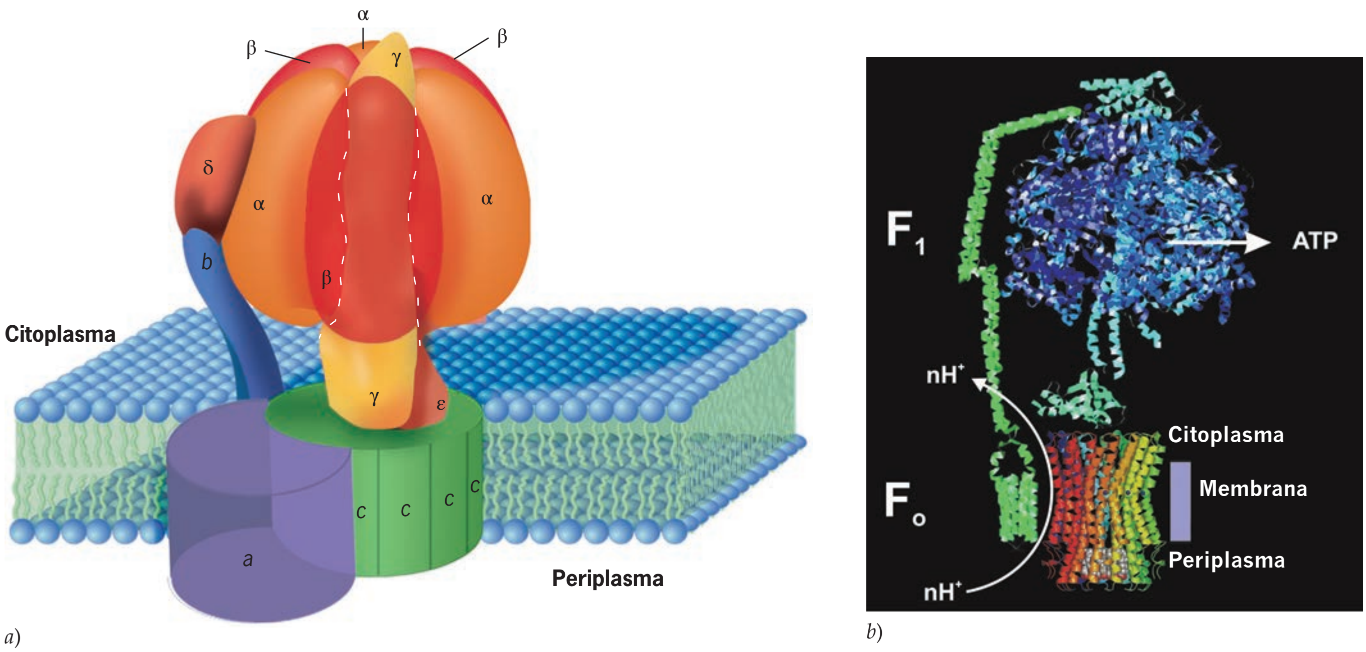



**FIGURA 5-24 La estructura de la ATP sintasa bacteriana.** *a*) Diagrama esquemático de la ATP sintasa de la *E. coli*. La enzima consiste en dos porciones principales, llamadas $F_1$ y $F_o$. La cabeza $F_1$ consiste en cinco subunidades diferentes en la proporción 3α : 3β : 1δ : 1γ : 1ε. Las subunidades α y β están organizadas en un matriz circular para formar la cabeza esférica de la partícula; la subunidad γ se mueve a través del núcleo de la ATP sintasa desde la punta de $F_1$ hasta $F_o$ para formar un tallo central; la subunidad ε ayuda a unir la subunidad γ a la base $F_o$. La base $F_o$, que está incrustada en la membrana plasmática bacteriana, consta de tres subunidades diferentes en la relación 1*a* : 2*b* : 10*c*. Como se discutirá más adelante, las subunidades *c* forman un anillo giratorio dentro de la membrana; las subunidades pares *b* de la base $F_o$ y la subunidad δ de la cabeza $F_1$ forma un tallo periférico que mantiene las subunidades α/β en una posición fija; y la subunidad *a* contiene el canal de protones que permite a los protones atravesar la membrana. La enzima de los mamíferos contiene de siete a nueve pequeñas subunidades adicionales cuyas funciones no están bien establecidas. *b*) Estructura tridimensional de la ATP sintasa bacteriana. Esta imagen está compuesta de varias estructuras parciales de la enzima de varios organismos.

FUENTE: De Wolfgang Junge y Nathan Nelson. *Science* 2005;308:643, © 2005, reimpreso con permiso de AAAS.

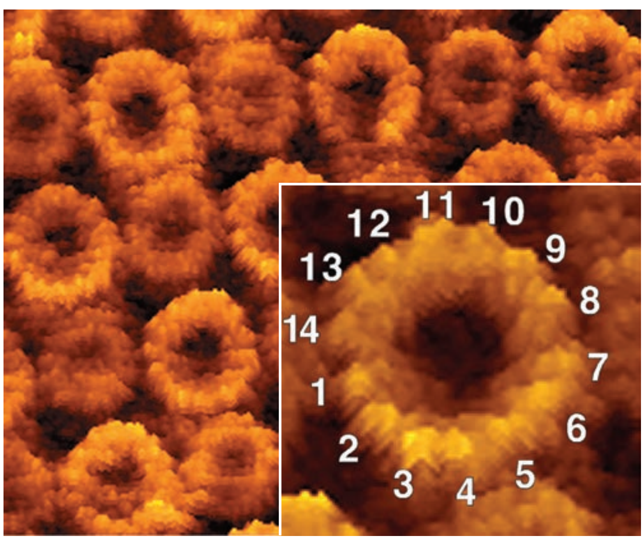



**FIGURA 5-25 Visualización del anillo c oligomérico de una ATP sintasa de cloroplasto.** Microscopía de fuerza atómica de un "campo" de anillos *c* que han sido aislados a partir de ATP sintasas de cloroplastos y reconstituidos como una matriz bidimensional dentro de una capa de lípidos artificiales. Anillos de dos diferentes diámetros están presentes en el campo porque se piensa que los oligómeros se sitúan en ambas orientaciones posibles dentro de la "membrana artificial". Vista de mayor resolución de uno de los anillos, que muestra que está compuesto por 14 subunidades (*Insertado*).

FUENTE: De Holger Seelert, *et al*. *Nature* 405:419,2000; © 2000, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd; imagen cortesía de Daniel J. Müller y Andreas Engel.

por ejemplo, tienen 10 subunidades *c*, mientras que una enzima del cloroplasto tiene 14 subunidades *c* (**FIGURA 5-25**) y, de manera sorprendente, la enzima de los mamíferos tiene solo ocho subunidades *c*. La base $F_o$ contiene un canal a través del cual los protones son conducidos desde el espacio intermembranoso a la matriz.

**REPASO**

1. Describa la estructura básica de la ATP sintasa.

## 5.8 El mecanismo de cambio de la fijación en la formación de ATP

¿Cómo un gradiente electroquímico de protones proporciona la energía requerida para conducir la síntesis de ATP? Para responder a esta pregunta, Paul Boyer de la UCLA publicó una hipótesis innovadora en 1979, llamada *mecanismo de cambio de la fijación*, que desde entonces ha ganado amplia aceptación.

### Componentes de la hipótesis del cambio de la fijación

En general, la hipótesis del cambio de la fijación tiene varios componentes distintos, que se discutirán en secuencia.

1. **La energía liberada por el movimiento de protones no se usa para impulsar la fosforilación de ADP de manera directa, sino principalmente para cambiar la afinidad de unión del sitio**

**activo para el producto ATP.** Se acostumbra a pensar en reacciones celulares que ocurren en un ambiente acuoso en el que la concentración de agua es 55 M, y los reactivos y productos se disuelven en el medio. Bajo estas condiciones, se requiere energía para conducir la formación del enlace covalente que une ADP con fosfato inorgánico para formar ATP. Se ha demostrado, sin embargo, que una vez que el ADP y el $P_i$ están unidos dentro del sitio catalítico de la ATP sintasa, los dos reactivos se condensan fácilmente para formar una molécula de ATP estrechamente unida sin la entrada de energía adicional. En otras palabras, incluso aunque la reacción

$$\text{ADP soluble} + P_i \text{ soluble} \rightarrow \text{ATP soluble} + H_2O$$

puede requerir el consumo de energía considerable (7.3 kcal/mol bajo condiciones estándar), la reacción

$$\text{ADP unida a la enzima} + P_i \text{ unido a la enzima} \rightarrow$$
$$\text{ATP} + H_2O \text{ unido a la enzima}$$

puede ocurrir de forma espontánea sin consumo de energía. Esto no significa que el ATP se puede formar a partir de ADP sin gasto de energía. En cambio, la energía es necesaria para la liberación del producto fuertemente ligado al sitio catalítico, más que en el evento de fosforilación en sí.

2. **Cada sitio activo progresa sucesivamente a través de tres conformaciones distintas que tienen diferentes afinidades para sustratos y producto.** Recuerde que el complejo $F_1$ tiene tres sitios catalíticos, cada una de las tres subunidades β. Cuando los investigadores examinaron las propiedades de los tres sitios catalíticos en una enzima *estática* (una que no participó en la rotación enzimática), los diferentes sitios exhibieron diferentes propiedades químicas. Boyer propuso que, en cualquier momento, los tres sitios catalíticos están presentes en diferentes conformaciones, lo que hace que tengan una afinidad diferente por los nucleótidos. En cualquier instante dado, un sitio está en la conformación "libre" o L en la que ADP y $P_i$ están débilmente unidos; un segundo sitio está en la conformación "tensa" o T en la que los nucleótidos (sustrato ADP + $P_i$, o producto ATP) están estrechamente ligados; y el tercer sitio está en la conformación "abierta" o conformación O, que, debido a que tiene una muy baja afinidad por los nucleótidos, permite la liberación de ATP.

   Aunque hubo diferencias entre los tres sitios catalizadores en una enzima estática, Boyer obtuvo evidencia de que todas las moléculas de ATP producidas por una enzima activa se sintetizaron por el mismo mecanismo catalítico. Parecía, en otras palabras, que los tres sitios catalíticos de la enzima estaban operando de manera idéntica. Para explicar la aparente contradicción entre la asimetría de la estructura de la enzima y la uniformidad de su mecanismo catalizador, Boyer propuso que cada uno de los tres sitios catalíticos pasaban de forma secuencial a través de las mismas conformaciones L, T y O (véase figura 5-27).
3. **El ATP se sintetiza mediante catálisis rotacional en la que una parte de la ATP sintasa rota en relación con otra parte.** Para explicar los cambios secuenciales en la conformación de cada uno de los sitios catalizadores, Boyer propuso que las subunidades α y β, que forman el anillo hexagonal de las subunidades dentro de la cabeza $F_1$ (figura 5-24), rotan relativas al tallo central. En este modelo, que se conoce como *catálisis rotacional*, la rotación es impulsada por el movimiento de protones a través de la membrana mediante el canal en la base $F_o$. Por tanto, de acuerdo con este modelo, la energía eléctrica almacenada del gradiente de protón se transduce en energía mecánica del tallo giratorio, que se transduce en energía química almacenada en ATP.

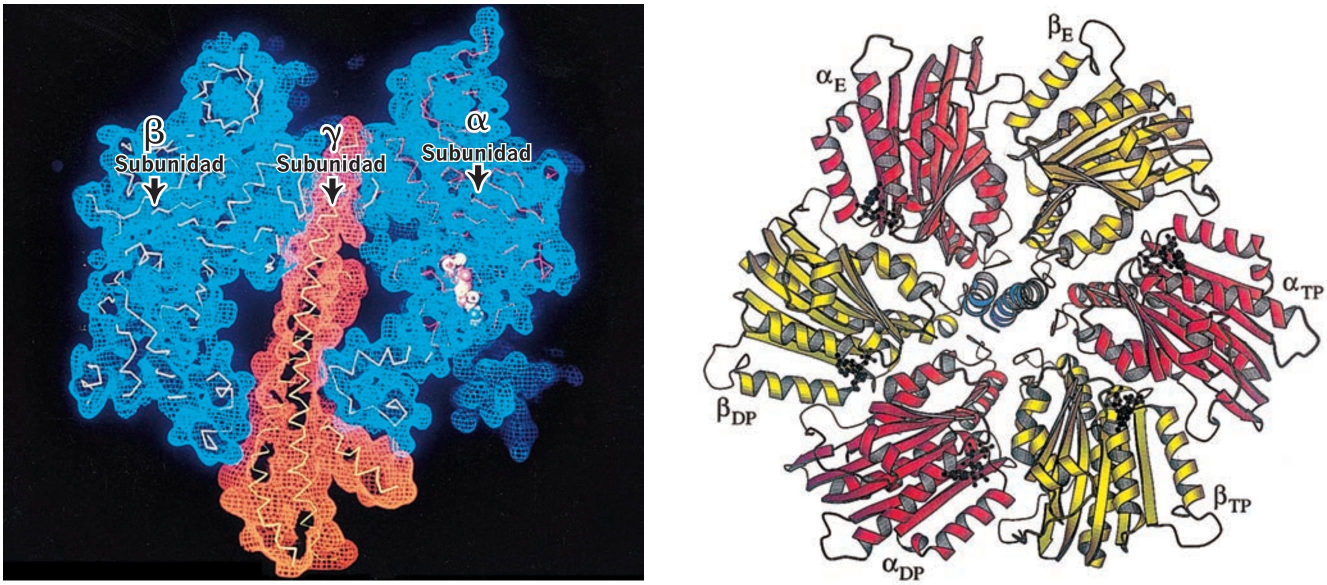
## Evidencia para apoyar el mecanismo de cambio de la fijación y la catálisis rotativa

La publicación en 1994 de un modelo atómico detallado de la cabeza de $F_1$ por John Walker y sus colegas del Consejo de Investigaciones Médicas en Inglaterra proporcionó una notable fuerza de evidencia estructural para apoyar el mecanismo de cambio de la fijación de Boyer. Primero, reveló la estructura de cada uno de los sitios catalíticos en una enzima estática, confirmando que difieren en su conformación y su afinidad por los nucleótidos. Las estructuras correspondientes a las conformaciones L, T y O se identificó en los sitios catalíticos de las tres subunidades β. En segundo lugar, reveló que la subunidad γ de la enzima está posicionada dentro de la ATP sintasa para transmitir cambios conformacionales desde el sector de membrana $F_o$ a los sitios catalíticos $F_1$. La subunidad γ podría ser percibida como una prolongación, como un eje del sector $F_o$ a través del tallo y en una cavidad central dentro de la esfera $F_1$ (**FIGURA 5-26*a***), donde entra en contacto con cada una de las tres subunidades β de forma diferente (figura 5-26*b*).

El extremo apical de la subunidad γ es altamente asimétrico, y en cualquier instante dado, diferentes caras de la subunidad γ interactúan con las diferentes subunidades β, lo que hace que adopten conformaciones diferentes (L, T y O). A medida que rota en pasos de 120°, cada sitio de unión en la subunidad γ interactúa de forma sucesiva con las tres subunidades de $F_1$. Durante un solo ciclo catalítico, la subunidad gira 360°, causando que cada sitio catalítico pase de manera secuencial a través de las conformaciones L, T y O. Este mecanismo se ilustra en forma de esquema en la figura 5-27 y se discute en detalle en la leyenda adjunta. Como se indica en la **FIGURA 5-27**, la condensación de ADP y $P_i$ para formar ATP ocurre mientras cada subunidad está en la conformación T. Como se indica en la figura 5-24*a*), la subunidad ε se asocia con la porción "inferior" de la subunidad, y las dos subunidades giran juntas como una unidad.

Se ha obtenido evidencia directa de la rotación de la subunidad γ relativa a la subunidades αβ en una variedad de experimentos. Si "ver es creer", entonces la manifestación más convincente llegó en 1997 con el trabajo de Masasuke Yoshida y sus colegas en el Instituto de Tecnología de Tokio y la Universidad de Keio en Japón. Estos investigadores idearon un ingenioso sistema para observar moléculas de enzimas individuales para catalizar la reacción inversa a partir de la que normalmente opera en la célula. Primero, prepararon una versión modificada de forma genética de la porción $F_1$ de la ATP sintasa, que consta de tres subunidades α, tres subunidades β y una subunidad γ ($\alpha_3\beta_3\gamma$) (**FIGURA 5-28*a***). Este polipéptido complejo luego fue fijado a un cubreobjetos de vidrio por su cabeza, y un filamento corto de actina marcado fluorescentemente se adjuntó al final de la subunidad γ que se proyectó en el medio (figura 5-28*a*). Cuando la preparación se incubó con ATP y se observó bajo el microscopio, el filamento de actina marcado fluorescentemente se vio girar como una hélice microscópica (figura 5-28*b*), impulsada por la energía liberada como moléculas de ATP cuando se unieron e hidrolizaron por los sitios catalíticos de las subunidades β.

Más recientemente, un tipo similar de complejo $F_1$ fue "obligado" a realizar la actividad más desafiante que normalmente se lleva a cabo dentro de la célula, la síntesis de ATP. En este estudio, un microscopio magnético perla se adjuntó a la subunidad γ de una sola molécula de $F_1$ y luego provocó un giro en sentido horario al someter la preparación a un campo magnético giratorio. Cuando una de estas moléculas $F_1$ fue colocada dentro de una pequeña microcámara transparente en presencia de ADP y $P_i$, la rotación forzada de la subunidad condujo a la síntesis de ATP,




*a*) *b*)

**FIGURA 5-26 La base estructural de la conformación del sitio catalítico.** *a*) Una sección a través de la cabeza $F_1$ muestra la organización espacial de tres de sus subunidades. La subunidad γ está construida con dos hélices extendidas y entrelazadas. Este tallo helicoidal se proyecta en la cavidad central de la $F_1$, y entre las subunidades α y β en cada lado. La conformación del sitio catalítico de la subunidad β (que se muestra a la izquierda) está determinada por su contacto con la subunidad γ. *b*) Una vista superior de la cabeza $F_1$ mostrando la disposición de las seis subunidades α y β (mostradas en rojo y amarillo) alrededor de la subunidad γ asimétrica (se muestra en azul). La subunidad γ está en posición para girar en relación α las subunidades circundantes. También es evidente que la subunidad γ establece contacto de forma diferente con cada una de las tres subunidades β, induciendo a cada una de ellas a adoptar una conformación diferente. $\beta_E$ corresponde a la conformación O, $\beta_{TP}$ a la conformación L y $\beta_{DP}$ a la conformación T

FUENTE: De J. P. Abrahams, *et al. Nature* 1994;370:624,627, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd. Cortesía de John E. Walker.

que se acumuló a concentraciones μM. Como se esperaría del modelo, se sintetizaron tres moléculas de ATP con cada giro de 360°. Cuando el campo magnético se desconectó, la subunidad γ rotó espontáneamente en la dirección inversa, impulsado por la hidrólisis del ATP recientemente sintetizado. Tomados en conjunto, estos innovadores experimentos de bioingeniería demuestran de forma inequívoca que la ATP sintasa funciona como un motor rotativo.

Las máquinas rotatorias son comunes en nuestra sociedad industrializada; nosotros utilizamos turbinas, taladros, ruedas y

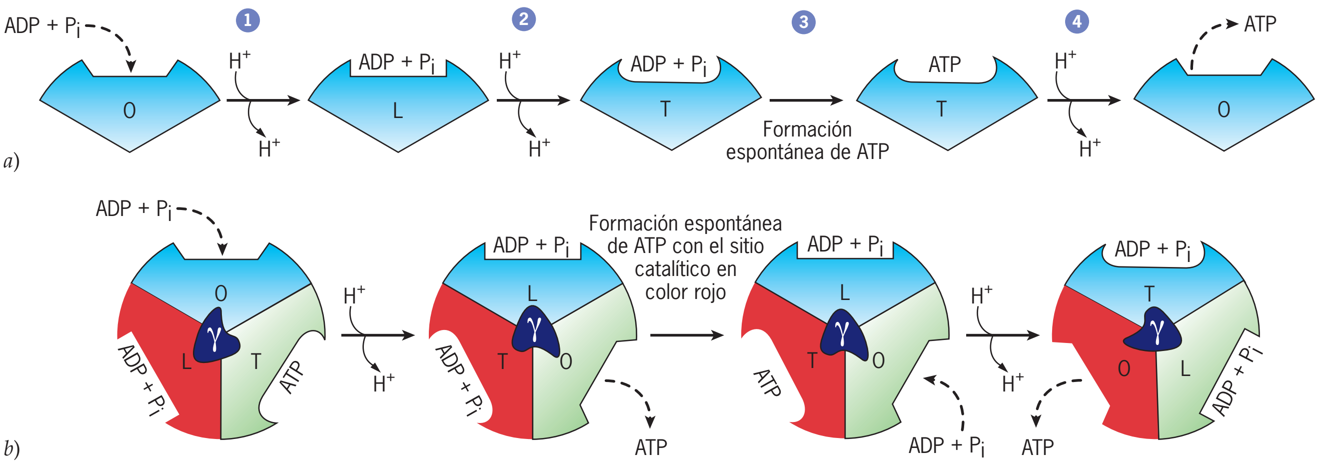



**FIGURA 5-27 El mecanismo de cambio de fijación para la síntesis de ATP.** *a*) Dibujo esquemático que muestra los cambios en un único sitio catalítico durante un ciclo de catálisis. Al comienzo del ciclo, el sitio está en la conformación abierta (O) y los sustratos ADP y $P_i$ están ingresando al sitio. En el paso 1, el movimiento de protones a través de la membrana induce un cambio a la conformación libre (L) en la que los sustratos están unidos de manera débil. En el paso 2, el movimiento de protones adicionales induce un cambio a la conformación tensa (T), en la que la afinidad por los sustratos aumenta, lo que hace que estén estrechamente unidos al sitio catalítico. En el paso 3, el ADP y $P_i$ fuertemente unidos se condensan de modo espontáneo para formar un ATP unido de manera fuerte; no se requiere cambio en la conformación para este paso. En el paso 4, el movimiento de protones adicionales induce un cambio a la conformación abierta (O), en la que la afinidad por el ATP disminuye mucho, permitiendo que el producto se libere desde el sitio. Una vez que el ATP se ha disociado, el sitio catalítico está disponible para la unión del sustrato, y el ciclo se repite. *b*) Dibujo esquemático que muestra los cambios simultáneos en los tres sitios catalíticos de la enzima. El movimiento de protones a través de la porción $F_o$ de la enzima causa la rotación de la subunidad γ asimétrica, que muestra tres caras diferentes de las subunidades catalíticas. A medida que la subunidad γ gira, induce cambios en la conformación del sitio catalítico de las subunidades β, provocando que cada sitio catalítico pase de manera sucesiva a través de las conformaciones T, O y L.

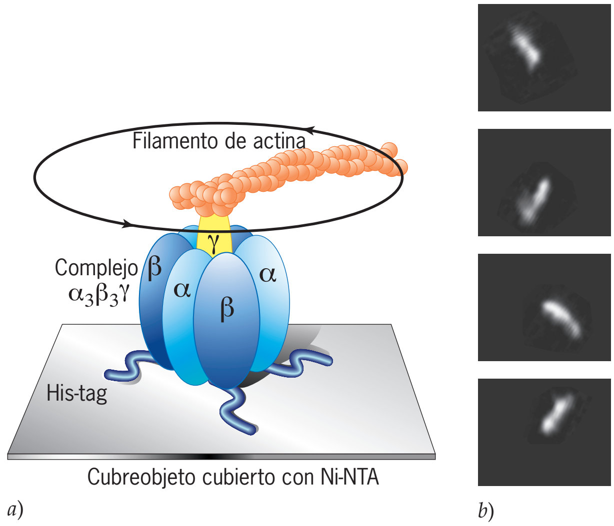



**FIGURA 5-28 Observación directa de la catálisis rotacional.** *a*) Para llevar a cabo el experimento, se preparó una versión modificada de una porción de la ATP sintasa que consiste en $\alpha_3\beta_3\gamma$. Cada subunidad β fue modificada para contener 10 residuos de histidina (His) en su extremo N-terminal, un sitio ubicado en la cara exterior (matriz) de la cabeza de $F_1$. Las cadenas laterales de histidina tienen una alta afinidad para una sustancia (Ni-NTA), que se usó para cubrir el cubreobjetos. La subunidad γ se modificó mediante la sustitución de uno de los residuos de serina cerca del final del tallo con un residuo de cisteína, que proporcionó un medio para unir el filamento de actina marcado fluorescentemente. En presencia de ATP, el filamento de actina se observó que rota en sentido antihorario (cuando se mira desde el lado de la membrana). A bajas concentraciones de ATP, los filamentos de actina podrían verse rotar en pasos de 120°. *b*) Una secuencia de cuatro fotogramas de un video de un filamento de actina rotando.

FUENTE: De H. Noji, *et al. Nature* 1997;386:299, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd; cortesía de Masasuke Yoshida.

hélices rotatorias, para nombrar solo algunos. Pero los dispositivos rotatorios son demasiado raros en los organismos vivos. No hay, por ejemplo, organelos giratorios conocidos en células eucariotas, articulaciones rotatorias en animales o estructuras de alimentación giratorias en el mundo biológico. De hecho, solo se conocen dos tipos de estructuras biológicas que contienen partes rotatorias: ATP sintasas (y proteínas relacionadas) que actúan como bombas iónicas) y los flagelos bacterianos [que se representan en la figura 1-14*a*), insertada], ambos pueden describirse como "nanomáquinas" rotatorias porque su tamaño se mide en nanómetros.

Los ingenieros han comenzado a inventar dispositivos a nanoescala hechos de materiales inorgánicos que algún día pueden llevar a cabo varios tipos de actividades mecánicas submicroscópicas. La construcción de motores a nanoescala plantea un desafío particular, y ya se han hecho los intentos de usar la ATP sintasa para alimentar dispositivos inorgánicos simples. Algún día los seres humanos podrán estar usando ATP, en lugar de electricidad para alimentar algunos de sus instrumentos más delicados.

**REPASO**

1. Describa los pasos en la síntesis de ATP según el mecanismo de cambio de la fijación.
2. Describa algunas de las pruebas que respaldan el mecanismo de cambio de la fijación.

## 5.9 Usando el gradiente de protones

En 1997, una comprensión detallada de la maquinaria de trabajo del complejo $F_1$ estaba a mano, pero las preguntas principales sobre la estructura y función de la porción $F_o$ unida a la membrana de la enzima quedó por ser respondida. Las más importantes entre ellas fueron: ¿cuál es la vía tomada por los protones mientras se mueven a través del complejo $F_o$, y cómo este movimiento conduce a la síntesis de ATP? Había sido postulado que:

1. Las subunidades *c* de la base $F_o$ se ensamblaban en un anillo que reside dentro de la bicapa lipídica (como en la figura 5-24*a*).
2. El anillo *c* está físicamente unido a la subunidad γ del tallo.
3. El movimiento "hacia abajo" de los protones a través de la membrana impulsa la rotación del anillo de las subunidades *c*.
4. La rotación del anillo *c* de $F_o$ proporciona la fuerza de torsión (*torque*) que impulsa la rotación de la subunidad adjunta, lo que lleva a la síntesis y liberación de ATP por subunidades catalíticas del anillo $F_1$.

Todas estas suposiciones han sido confirmadas. Veremos cada uno de estos aspectos con más detalle.

### La función de la parte $F_o$ de la ATP sintasa en la síntesis de ATP

Un cuerpo de evidencia, que incluye cristalografía de rayos X y microscopia atómica de fuerza, ha demostrado que las subunidades *c* están, de hecho, organizadas en un círculo para formar un complejo en forma de anillo (figura 5-25). Las micrografías electrónicas de alta resolución indican que las dos subunidades *b* y la única subunidad *a* del complejo $F_o$ residen fuera del anillo de las subunidades *c*, como se muestra en la figura 5-24. Se cree que las subunidades *b* son principalmente componentes estructurales de la ATP sintasa. Las dos *b* subunidades alargadas forman un *tallo periférico* que conecta las porciones $F_o$ y $F_1$ de la enzima (figura 5-24*b*) y, junto con la subunidad *d* de $F_1$, se cree que mantienen las subunidades $\alpha_3\beta_3$ en una posición fija mientras la subunidad gira dentro del centro del complejo.

La rotación del anillo *c* de $F_o$ durante la síntesis de ATP ha sido demostrada en numerosos experimentos, confirmando que tanto el anillo *c* y la subunidad γ actúan como rotores durante la actividad enzimática. ¿Cómo están estas dos "partes móviles" conectadas? Cada subunidad *c* está construida como una horquilla: contiene dos hélices transmembrana conectadas por un bucle hidrófilo que se proyecta hacia la cabeza de $F_1$. Se piensa que el bucle hidrofílico se sitúa en la parte superior de las subunidades *c* para formar un sitio de unión para las bases de las subunidades γ y ε, que juntas actúan como un "pie" que está firmemente unido al anillo *c* (figuras 5-24 y 5-29). Como resultado de este accesorio, la rotación del anillo *c* conduce a la rotación de la subunidad γ adjunta, que puede ocurrir a ritmos de más de 100 revoluciones por segundo.

El mecanismo por el cual los movimientos de $H^+$ conducen a la rotación del anillo *c* es más complejo y menos comprendido. En la **FIGURA 5-29** se proporciona un modelo de cómo los iones $H^+$ pueden fluir a través del complejo $F_o$. Se debe tener en cuenta en la siguiente discusión de este modelo, 1) que las subunidades del anillo *c* se mueven de manera sucesiva al lado de una subunidad *a estacionaria* y 2) que los protones son recogidos del espacio intermembranoso uno a la vez por cada subunidad *c* y llevados *completamente alrededor de un círculo* antes de que sean liberados en la matriz. En este modelo, cada subunidad *a* tiene dos medios canales que están físicamente separados (*offset*) uno de otro. La mitad de un canal conduce desde el espacio intermembranoso (el

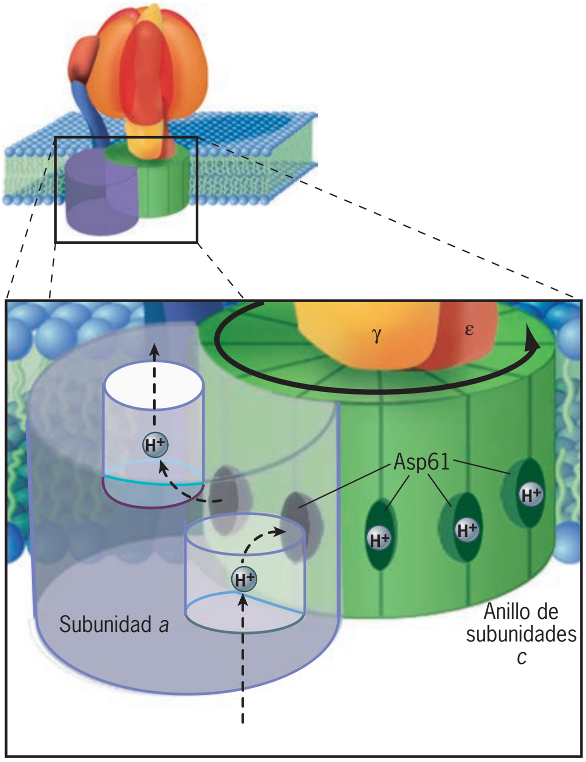



**FIGURA 5-29 Un modelo en el que la difusión de protones se acopla a la rotación del anillo c del complejo $F_o$.** Como se discute en el texto, la cantidad de subunidades en el anillo *c* es variable. En pos de la simplicidad, este anillo c consta de 12 subunidades. Se propone en este modelo que cada protón desde el espacio intermembranoso entra en un medio canal dentro de la subunidad *a* y luego se une a un residuo ácido (Asp61 en *E. coli*), que puede acceder a una de las subunidades *c*. La unión de protones induce un cambio conformacional que hace que el anillo se mueva casi 30°. El protón unido es transportado en un círculo completo por la rotación del anillo *c* y luego se libera en un segundo medio canal que se abre a la matriz. Una sucesión de protones que participan en esta actividad causa que el anillo c gire en dirección contraria a las manecillas del reloj como se muestra.

citosólico) al centro de la subunidad *a*, y el otro conduce desde el medio de una subunidad *a* en la matriz. Se propone que cada protón se mueva desde el espacio intermembranoso a través del medio canal y se una a un residuo ácido cargado de forma negativa situado en la superficie de la subunidad *c* adyacente. Este residuo ácido es aparentemente un ácido aspártico en *E. coli* (figura 5-29), pero es un residuo del ácido glutámico en la mitocondria animal. La unión del protón al grupo carboxilo de ese residuo hace que esa subunidad gire alrededor de 308 en dirección contraria a las manecillas del reloj. El movimiento de la recientemente protonada subunidad *c* trae la subunidad contigua en el anillo (que fue protonada en un paso anterior) en alineación con el segundo medio canal de la subunidad *a*. Una vez allí, el residuo ácido libera su protón asociado, que se difunde en la matriz. Después de la disociación del protón, la subunidad *c* vuelve a su conformación original y está listo para aceptar otro protón del espacio intermembranoso y se repite el ciclo.

De acuerdo con este modelo, el residuo de unión a protones de cada subunidad *c* actúa como un portador de protones giratorio. Un protón salta sobre el transportador en un sitio seleccionado de recogida y luego se lleva alrededor de un círculo antes de ser liberado en un sitio seleccionado. El movimiento del anillo es impulsado por los cambios conformacionales asociados con la protonación secuencial y la desprotonación del residuo ácido de cada subunidad *c*. Como consecuencia, la cantidad de protones translocados para cada rotación del anillo *c* con frecuencia se considera que es igual al número de subunidades que forman el anillo, aunque esto no siempre es validado de forma experimental. Se ha demostrado que el anillo *c* contiene entre ocho y 15 subunidades, dependiendo de la fuente. Por el bien de la simplicidad, se describirá un anillo *c* compuesto por 12 subunidades, como se ilustra en la figura 5-29. En este caso, la asociación/disociación de cuatro protones de la manera descrita movería el anillo 120°. El movimiento 120° del anillo *c* conduciría una rotación correspondiente de 120° de la subunidad γ adjunta, lo que conduciría a la liberación de una nueva síntesis molecular de ATP por el complejo $F_1$. De acuerdo con esta estequiometría, la translocación de 12 protones llevaría a una rotación de 360° del anillo *c* y la subunidad γ, y la síntesis y liberación de tres moléculas de ATP. Si el anillo *c* tuviera mayor o menor cantidad de 12 subunidades, la relación $H^+$/ATP cambiaría, pero esto puede acomodarse de forma fácil dentro del modelo básico de rotación impulsada por protones que se muestra en la figura 5-29.

## Otras funciones para la fuerza protón motriz, además de la síntesis de ATP

Aunque la producción de ATP puede ser la actividad más importante de las mitocondrias, estos organelos están involucrados en muchos otros procesos, que requieren la entrada de energía. A diferencia de la mayoría de los organelos que se basan principalmente en la hidrólisis de ATP para impulsar sus actividades, las mitocondrias dependen de una fuente alternativa de energía: la fuerza protón motriz. Por ejemplo, la fuerza protón motriz impulsa la captación de ADP y $P_i$ en las mitocondrias a cambio de ATP y $H^+$, respectivamente. El intercambio de ATP por ADP a través de la membrana se logra mediante la *translocasa de nucleótidos de adenina* (ANT, *adenine nucleotide translocase*), la cual permite que el ATP producido dentro de las mitocondrias esté disponible para cumplir las necesidades energéticas del resto de la célula. Estas y otras actividades que tienen lugar durante la respiración aeróbica se resumen en la **FIGURA 5-30**. En otros ejemplos, la fuerza motriz del protón puede ser utilizado como fuente de energía para "extraer" los iones de calcio en la mitocondria, para conducir los eventos de fusión mitocondrial y para formar polipéptidos dirigidos a entrar en la mitocondria desde la matriz (figura 8-47).

**REPASO**

1. Describa un mecanismo propuesto por el cual la difusión del protón desde el espacio intermembranoso en la matriz impulsa la fosforilación de ADP.

## 5.10 Peroxisomas

Las **peroxisomas** son vesículas simples unidas a la membrana (figura 5-31*a*) con un diámetro de 0.1 a 10 μm que puede contener un núcleo denso y cristalino de enzimas oxidativas. Las peroxisomas son organelos multifuncionales, que contienen más de 50 enzimas involucradas en diversas actividades como la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, *very-long-chain fatty acids*) cuyas cadenas contienen de forma característica de 24 a 26 carbonos y la síntesis de plasmalógenos, que son una clase inusual de fosfolípidos en el que uno de los ácidos grasos está ligado al glicerol por un enlace de éter, en lugar de un enlace éster. Los plasmalógenos son muy abundantes en las vainas de mielina que aíslan los axones en el cerebro (figura 4-5). Las anomalías en la síntesis de los plasmalógenos pueden conducir a graves disfunciones neurológicas. La enzima luciferasa, que genera la luz emi-

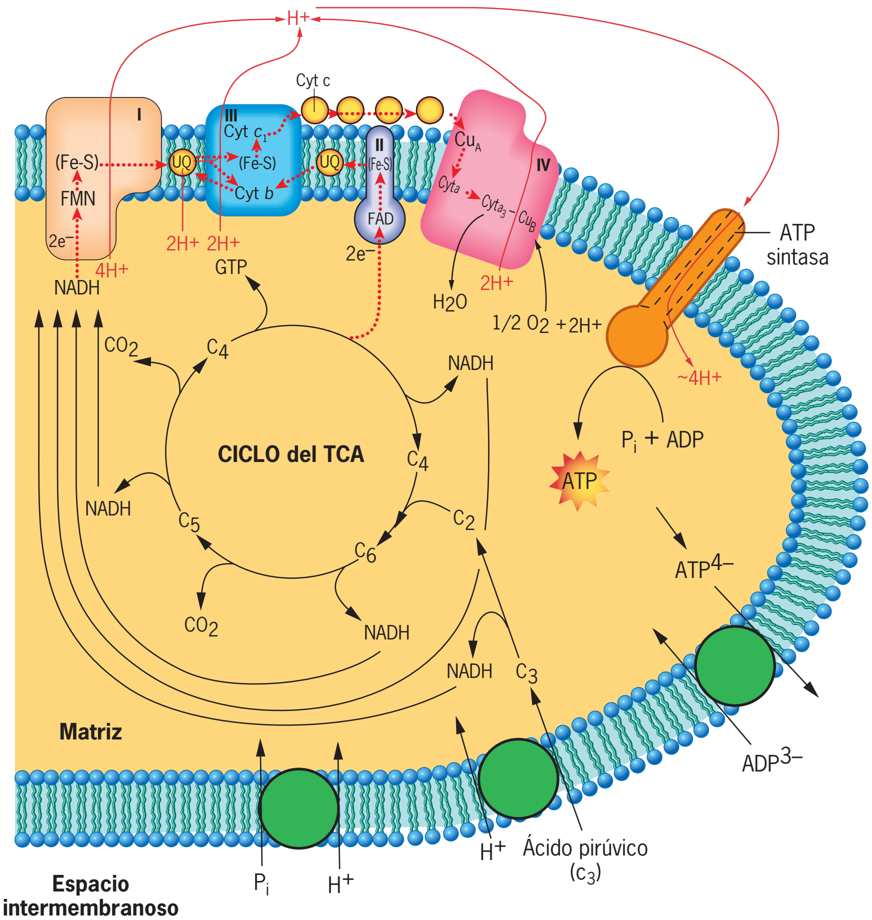
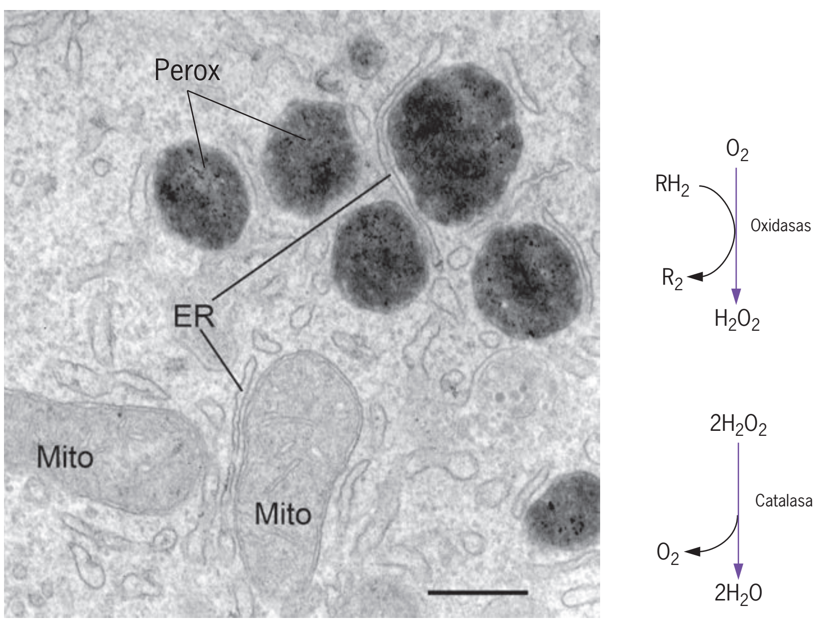



**FIGURA 5-30 Sumario de las principales actividades durante la respiración anaeróbica en una mitocondria.**

tida por las luciérnagas, es también una enzima peroxisomal. Los peroxisomas se incluyen en el presente capítulo porque comparten varias propiedades con las mitocondrias: tanto las mitocondrias como los peroxisomas se forman al separarse de los organelos preexistentes, con el uso de algunas de las mismas proteínas para lograr la hazaña; ambos tipos de organelos preformados importan las proteínas del citosol ("sección 8.21"); y ambos participan en tipos similares de metabolismo oxidativo. De hecho, al menos una enzima, la alanina/glioxilato aminotransferasa, se encuentra en las mitocondrias de algunos mamíferos (p. ej., los gatos y los perros) y en los peroxisomas de otros mamíferos (p. ej., los conejos y los seres humanos). Los dos tipos de organelos se han vuelto aún más estrechamente vinculados con informes recientes de que las mitocondrias forman vesículas que llevan carga destinada a los peroxisomas.

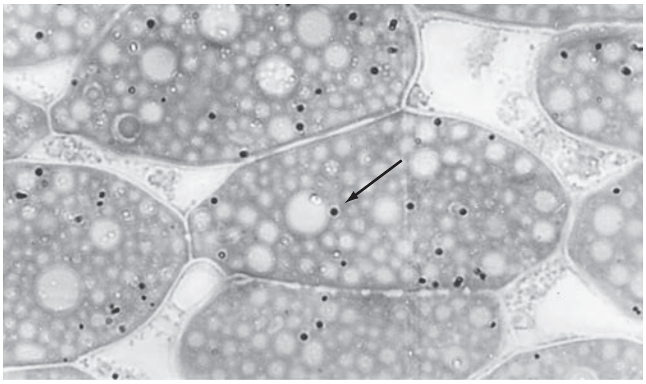
Estos organelos fueron llamados "peroxisomas" porque son el sitio de síntesis y degradación del peróxido de hidrógeno (H2O2), un oxidante muy reactivo y agente tóxico. El peróxido de hidrógeno se produce por un número de enzimas peroxisomales, incluyendo la urato oxidasa, la glucolato oxidasa y las oxidasas de aminoácidos, que utilizan el oxígeno molecular para oxidar sus respectivos sustratos (**FIGURA 5-31*b***). El $H_2O_2$ generado en estas reacciones se descompone rápidamente por la enzima catalasa, que está presente en altas concentraciones en estos organelos. La importancia de los peroxisomas en el metabolismo humano es evidente en la discusión adjunta en la "Perspectiva humana".




*a*) *b*)

**FIGURA 5-31. La estructura y función de los peroxisomas.** *a*) Microfotografía electrónica de una sección de una célula de hígado de rata, que había sido teñida de catalasa, una enzima localizada en los peroxisomas. Tenga en cuenta la estrecha asociación entre el teñido oscuro de los peroxisomas y las mitocondrias. Una micrografía electrónica de un peroxisoma dentro de una célula vegetal se muestra en la figura 6-23. La barra es igual a 250 nm. *b*) Los peroxisomas contienen enzimas que llevan a cabo la reducción en dos pasos del oxígeno molecular al agua. En el primer paso, una oxidasa elimina los electrones de una variedad de sustratos ($RH_2$), como el ácido úrico o los aminoácidos. En el segundo paso, la enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno formado en el primer paso al agua.

FUENTE: De Michael Schrader y Yisang Yoon. *Bioess* 2007;29:1106. © 2007, John Wiley & Sons.



10 µm

**FIGURA 5-32 La localización de las glioxisomas dentro de las plántulas de las plantas.** La micrografía lumínica de una sección a través de cotiledones de semillas de algodón integradas. Los glioxisomas, que se observan como pequeñas estructuras oscuras (flecha), son visibles por una tinción citoquímica por la enzima catalasa.

FUENTE: De Richard N. Trelease y Kent D. Chapman. *J Cell Biol* 1991;115:998, figura 1. © 1991 Rockefeller University Press.

Los peroxisomas también están presentes en las plantas. Las plántulas de las plantas contienen un tipo especializado de peroxisoma, llamado **glioxisoma** (**FIGURA 5-32**). Las plántulas de las plantas dependen de los ácidos grasos almacenados para proporcionar energía y material para formar una nueva planta. Una de las principales actividades metabólicas en estas plántulas en germinación es la conversión de ácidos grasos almacenados a carbohidratos. El desmontaje de ácidos grasos almacenados genera acetil CoA, que se condensa con el oxaloacetato (OAA) para el formar citrato, que luego se convierte en glucosa por una serie de enzimas del ciclo de glioxilato localizado en el glioxisoma. La función de las peroxisomas en el metabolismo de las células de la hoja se discute en la "sección 6.9".



**REPASO**

1. ¿Cuáles son algunas de las principales actividades de los peroxisomas? ¿Cuál es la función de la catalasa en estas actividades?
2. ¿De qué manera son las peroxisomas similares a las mitocondrias? ¿De qué manera son únicas?

# 5.11 PERSPECTIVA HUMANA

## Enfermedades que resultan de una función mitocondrial o peroxisomal anormal

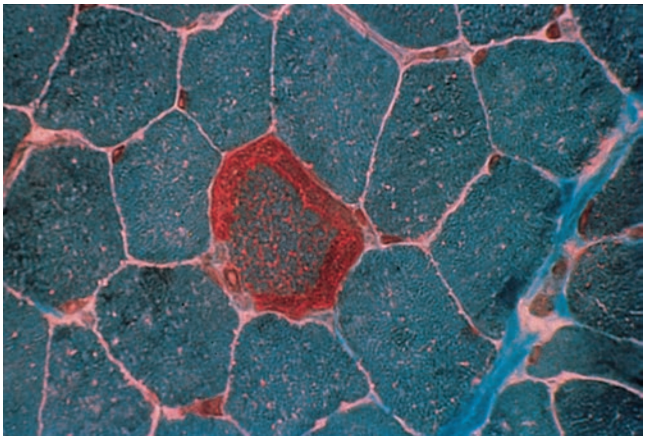
### Mitocondrias

En 1962 Rolf Luft, de la Universidad de Estocolmo, en Suecia, informó sobre un estudio de mitocondrias aisladas de una mujer, quien había estado sufriendo de fatiga de larga data y debilidad muscular, y que exhibió una tasa metabólica y temperatura corporal elevada. Las mitocondrias de esta paciente eran de alguna manera liberadas de su control respiratorio normal. Normalmente, cuando los niveles de ADP son bajos, las mitocondrias aisladas detienen la oxidación del sustrato. Por el contrario, las mitocondrias de esta paciente continuaron oxidando el sustrato a un ritmo alto, incluso en ausencia de ADP para fosforilar, produciendo calor en lugar de trabajo mecánico. Desde ese informe inicial, se han rastreado una variedad de trastornos de disfunción mitocondrial. La mayoría de estos trastornos se caracterizan por la degeneración del tejido muscular o cerebral, los que utilizan cantidades excepcionalmente grandes de ATP. Estas afecciones varían en gravedad de las enfermedades que conducen a la muerte durante la infancia; a los trastornos que producen convulsiones, ceguera, sordera, y/o episodios similares a un accidente cerebrovascular; a afecciones más suaves caracterizadas por la intolerancia al ejercicio o espermatozoides no móviles. Los pacientes con serias afecciones a menudo tienen fibras musculares esqueléticas anormales, que contienen grandes agregados periféricos de mitocondrias (**FIGURA 1*a***). Un examen más detallado de las mitocondrias revela un gran número de inclusiones anormales (figura 1*b*). Las proteínas de la cadena respiratoria se dividen entre el genoma nuclear y mitocondrial, y las enfermedades que afectan la función respiratoria pueden ser causadas por mutaciones en genes nucleares o mitocondriales.

La herencia de los trastornos mitocondriales contrasta de varias maneras con la herencia mendeliana de los genes nucleares. Las mitocondrias presentes en las células de un embrión humano se derivan de manera exclusiva de las mitocondrias que estaban presentes en el óvulo en el momento de la concepción sin ninguna contribución del espermatozoide fertilizador. En consecuencia, los trastornos mitocondriales son hereditarios de la madre. Además, las mitocondrias de una célula pueden contener un mezcla de mtDNA normal (es decir, tipo salvaje) y mutante, una condición conocida como *heteroplasmia*. El nivel de mtDNA mutante puede variar de un órgano a otro dentro de un solo individuo, y es solo cuando una preponderancia de las mitocondrias de un tejido en particular contiene información genética defectuosa que los síntomas clínicos usualmente aparecen. Debido a esta variabilidad, los miembros de una familia que portan la misma mutación de mtDNA puede exhibir de manera sorprendente diferente síntomas.

El flujo de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones mitocondrial ha demostrado ser una fuente importante de radicales de oxígeno mutagénico, llamadas *especies de oxígeno reactivo* (ROS, *reactive oxygen species*) (página 34). Debido a su proximidad a la membrana mitocondrial interna donde se produce el transporte de electrones, se cree que el mtDNA está a un nivel de ataque mucho mayor que el DNA nuclear. En adición, el DNA nuclear está mejor protegido contra el daño persistente por la presencia de una mayor variedad de sistemas de reparación del DNA (sección 13.8). Por estas razones, el mtDNA experimenta más de 10 veces la tasa de mutación del DNA nuclear. Las mutaciones mitocondriales son particularmente probables que se acumulen en las células que permanecen en el cuerpo por largos periodos, como las del tejido nervioso y muscular. Los cambios degenerativos en la función mitocondrial se piensa contribuyan a una serie de enfermedades neurológicas comunes con el inicio adulto, principalmente la enfermedad de Parkinson (PD, *Parkinson's disease*). Esta posibilidad de formas originales salió a la luz a principios de la década de 1980, cuando una serie de jóvenes drogadictos comparecieron en los hospitales con el inicio repentino de temblores musculares severos que son característicos de la enfermedad de Parkinson avanzada en adultos mayores. Se descubrió que estos individuos se habían inyectado por vía intravenosa heroína sintética contaminada con

(*continúa*)


a)

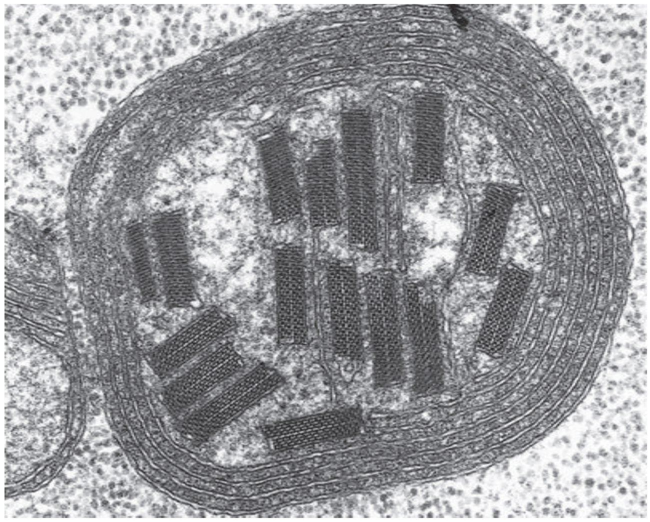

b)

**FIGURA 1 Los trastornos mitocondriales en el músculo esquelético.** *a*) Fibras rojas rasgadas. Estas fibras musculares degenerativas provienen de una biopsia de un paciente y muestran acumulaciones de "manchas" de tinción roja justo debajo de la membrana plasmática de las células, que se deben a la proliferación anormal de las mitocondrias. *b*) La microfotografía electrónica que muestra estructuras cristalinas dentro de la matriz mitocondrial a partir de células de un paciente con mitocondrias anormales.

FUENTE: *a*) Cortesía de Donald R. Johns; *b*) De John A. Morgan-Hughes y D. N. Landon, en A. G. Engel y C. Franzini-Armstrong (eds.). *Myology*. 2a. ed. Reproducida con permiso de McGraw-Hill, © 1994.

un compuesto llamado MPTP. Estudios posteriores revelaron que el MPTP causaba daño al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, que conduce a la muerte de las células nerviosas en la misma región del cerebro (la sustancia negra) que se ve afectada en pacientes con PD. Cuando las células de la sustancia negra de los pacientes con PD fueron estudiados, también encontraron que tiene una disminución marcada y selectiva en la actividad del complejo I. Esta deficiencia del complejo I probablemente se deba a un aumento documentado en la tasa de mutación en el DNA de estas células en comparación con otras células. Los estudios también han implicado la exposición a ciertos pesticidas, particularmente la rotenona, un conocido inhibidor del complejo I, como un factor de riesgo para el desarrollo del PD. La administración de la rotenona en ratas causa la destrucción de neuronas productoras de la dopamina, que es característico de la enfermedad humana. El posible vínculo entre la rotenona y la enfermedad del Parkinson está siendo investigado.

Se ha especulado desde hace mucho tiempo que la acumulación gradual de mutaciones en el mtDNA es un importante factor causal del envejecimiento humano. Esta hipótesis está fundamentada por el hecho de que las células tomadas de personas mayores tienen un mayor número de mutaciones de mtDNA mitocondrial, en comparación a las mismas células de individuos más jóvenes. ¿Pero son estas mutaciones una causa del envejecimiento o una consecuencia de un mayor proceso básico de envejecimiento subyacente que afecta a muchas propiedades fisiológicas? Los experimentos que pueden ser los más relevantes para esta pregunta se han realizado en ratones que son homocigotos para un gen mutante (llamado *Polg*) que codifica la enzima que se replica a mtDNA. El mtDNA de estos ratones acumula un nivel de mutaciones mucho más alto que el de sus compañeros de camadas normales. Estos ratones "mutantes" parecen normales durante los primeros 6 a 9 meses de edad, pero luego desarrollan de forma acelerada signos de envejecimiento prematuro, como pérdida de audición, canas y osteoporosis (**FIGURA 2**). Mientras los ratones de control tienen una vida útil de más de dos años, los miembros del grupo experimental en vivo, en promedio, solo alrededor de un año. Es curioso que los animales modificados de forma genética no muestren evidencia de mayor daño oxidativo (radicales libres): por lo que no es esclarecedor cómo la mayor tasa de mutación de mtDNA causa este fenotipo. También es notable que los ratones que son heterocigotos para la mutación *Polg* tiene una tasa de mutación de mtDNA elevada (aunque mucho menos que los homocigotos); sin embargo, no presentan un acortamiento de la esperanza de vida. Si las mutaciones de mtDNA fueron un importante contribuyente al proceso de envejecimiento normal, estos heterocigotos deberían tener una vida mucho más corta. Estos resultados en conjunto sugieren que las mutaciones en mtDNA pueden ser suficientes para causar el envejecimiento prematuro de un animal, pero no son necesariamente requeridos como parte del proceso de envejecimiento *normal*. Sigue sin estar claro si estos estudios en ratones conducen directamente al envejecimiento humano.



**FIGURA 2 Un fenotipo de envejecimiento prematuro causado por un aumento de las mutaciones en el mtDNA.** En la fotografía se muestra un ratón normal de 13 meses de edad y su compañero de camada "envejecido", cuyo DNA mitocondrial alberga una cantidad anormalmente alta de mutaciones. Este fenotipo de envejecimiento prematuro fue causado por una mutación en el gen nuclear que codifica el DNA polimerasa responsable de la replicación de mtDNA.

FUENTE: Cortesía de Jeff Miller, Universidad de Wisconsin-Madison, imagen proporcionada por GC Kujoth.

## Peroxisomas

El síndrome de Zellweger (ZS, *Zellweger syndrome*) es una rara enfermedad hereditaria caracterizada por una variedad de anomalías neurológicas, visuales y hepáticas que conducen a la muerte durante la infancia temprana. En 1973 Sidney Goldfischer y sus colegas del Colegio de Medicina Albert Einstein informaron

que el hígado y las células renales de estos pacientes carecían de peroxisomas. Las investigaciones posteriores revelaron que los peroxisomas no estaban del todo ausentes de las células de estos individuos, pero más bien, estaban presentes como "fantasmas" membranosos vacíos, que son organelos que carecen de las enzimas que normalmente se encuentran en las peroxisomas. No es que estos individuos no puedan sintetizar enzimas peroxisomales, sino que las enzimas no pueden ser importadas en los peroxisomas y permanecen en gran medida en el citosol donde no pueden llevar a cabo sus funciones normales. Los estudios genéticos de células de pacientes con el ZS mostraron que el trastorno puede surgir de mutaciones en al menos 12 genes diferentes, toda la codificación de proteínas implicadas en la captación de enzimas peroxisomales del citosol.

A diferencia del síndrome de Zellweger, que afecta a una gran variedad de funciones peroxisomales, una serie de enfermedades hereditarias se caracterizan por la ausencia de una sola enzima peroxisomal. Una de estas enfermedades de deficiencia enzimática única es la adrenoleucodistrofia ligada a X. (X-ALD, *X-linked adrenoleukodystrophy*), que fue el tópico de la película *El aceite de Lorenzo,* de 1993. Los niños con la enfermedad con frecuencia no se ven afectados hasta la mitad de la infancia, cuando los síntomas de insuficiencia suprarrenal y disfunción neurológica comienzan. La enfermedad es el resultado de un defecto en una proteína de membrana (ABCD1) que transporta los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) en los peroxisomas, donde normalmente son metabolizados. En ausencia de esta proteína, los VLCFA se acumulan en el cerebro y destruyen las vainas de mielina que aíslan las células nerviosas. En *El aceite de Lorenzo*, los padres de un niño afectado con X-ALD descubren que una dieta rica en ciertos ácidos grasos puede retrasar el progreso de la enfermedad. Los estudios posteriores han generado resultados contradictorios con respecto al valor de esta dieta. Una serie de pacientes con X-ALD han sido tratados con éxito con el trasplante de la médula ósea, que proporciona células normales capaces de metabolizar el VLCFA, y mediante la administración de fármacos (p. ej., la lovastatina), que puede disminuir los niveles de VLCFA. Las perspectivas más conmovedoras para el tratamiento de X-ALD llegaron en 2009 con el informe de que dos niños en Francia se habían tratado con éxito mediante la terapia génica. En este ensayo clínico, las células madre se aislaron de la sangre, una copia normal del gen *ABCD1* se introdujo en las células, que eran luego infundidas de nuevo en los pacientes de los que se derivaron. Algunas de estas células madre modificadas de forma genética dieron lugar a células diferenciadas que tomaron residencia en el cerebro. Estas células fueron capaces de producir la proteína faltante, lo que condujo a la detención de una mayor neurodegeneración. Años después de la terapia, los niños aún no muestran una mayor progresión de la enfermedad, pero hasta ahora toda la evaluación de esta estrategia se basa en este único informe de dos individuos. Se inició un ensayo clínico a gran escala de este tratamiento en 2013.

# Preguntas analíticas

1. Considere la reacción A: H + B ⇌ B:H + A. Si, en el equilibrio, la relación de [B: H]/[B] es igual a 2.0, se puede concluir que 1) B:H es el agente reductor más fuerte de los cuatro compuestos; 2) la pareja (A:H-A) tiene un potencial redox más negativo que la pareja (B:H-B); 3) ninguno de los cuatro compuestos son citocromos; 4) los electrones asociados con B son de energía más alta que aquellos asociados con A. ¿Cuáles de las declaraciones anteriores son verdaderas? Dibuje una de las reacciones medias para esta reacción redox.
2. El DNA mitocondrial es replicado por la enzima DNA polimerasa. Los ratones "mutantes" discutidos en la página 196 tenían este fenotipo porque poseían una polimerasa γ que tendía a producir errores al copiar su plantilla de mtDNA. Varias limitaciones en la interpretación de estos estudios en términos del proceso de envejecimiento normal fueron señalados. ¿Qué crees que se podría aprender al generar ratones que tenían una polimerasa γ superprecisa, es decir, una que cometió menos errores que la versión normal (tipo salvaje)?
3. La proteína A es una flavoproteína con un potencial redox de –0.2 V. La proteína B es un citocromo con un potencial redox de +0.1 V.
   *a*) Dibuje las reacciones medias para cada uno de estos dos transportadores de electrones.
   *b*) Diga la reacción que ocurriría si uno fuera a mezclar reducidos de moléculas A y moléculas B oxidadas.
   *c*) ¿Qué dos compuestos en la reacción de la parte *b*) estarían presentes en la mayor concentración cuando la reacción alcanzó el equilibrio?
4. De las siguientes sustancias: la ubiquinona, el citocromo *c*, el $NAD^+$, el NADH, el $O_2$, el $H_2O$, ¿cuál es el agente reductor más fuerte? ¿Cuál es el agente oxidante más fuerte? ¿Cuál tiene la mayor afinidad para electrones? (Véase **video tutorial cuantitativo**).
5. Si se determinara que la membrana mitocondrial interna era libremente permeable a los iones de cloruro, ¿qué efecto podría tener en la fuerza protón motriz a través de la membrana mitocondrial interna?
6. Observe la caída de energía durante el transporte de electrones que se muestra en la figura 5-14. ¿Cómo sería este perfil diferente, si el donador original de electrones fuera la $FADH_2$ en lugar del NADH?
7. ¿Esperaría que la importación de $P_i$ condujera a una disminución en la fuerza motriz del protón? ¿Por qué?
8. En el cuadro de potenciales redox estándar en la tabla 5-1, la pareja oxaloacetato-malato es menos negativa que la pareja $NAD^+$-NADH. ¿Cómo son estos valores compatibles con la transferencia de electrones de malato a $NAD^+$ en el ciclo del TCA?
9. ¿Cuántos trifosfatos de alta energía se forman por el nivel de fosforilación del sustrato durante cada vuelta del ciclo del TCA (solo considere las reacciones del ciclo del TCA)? ¿Cuántos se forman como resultado de la fosforilación oxidativa? ¿Cuántas moléculas de $CO_2$ son liberadas? ¿Cuántas moléculas de FAD se reducen? ¿Cuántos pares de electrones se eliminan del sustrato?
10. El ensamblaje de grupos Fe-S, que tiene lugar en la matriz mitocondrial, es altamente vulnerable a la presencia del $O_2$. Dada la importancia de las mitocondrias en el metabolismo aeróbico, ¿este parece ser un lugar poco probable para que ocurra este proceso?
11. La caída en $\Delta G°$ de un par de electrones a medida que pasan de NADH a $O_2$ es de –52.6 kcal/mol, y la $\Delta G°'$ de formación de ATP es de +7.3 kcal/mol. Si se forman tres ATP para cada par de electrones eliminado del sustrato, ¿se puede concluir que la fosforilación oxidativa es solo de 21.9/52.6 o 42% eficiente? ¿Por qué o por qué no?
12. ¿Estimaría que las mitocondrias activas de forma metabólica y aisladas acidifican o alcalinizan el medio en el que fueron suspendidas? ¿Por qué?
13. Supongamos que se requiere el movimiento de tres protones para la síntesis de una molécula de ATP. Calcule la energía libe-

rada por el paso de tres moles de protones en la matriz cuando la fuerza motriz del protón se mide a 220 mV (véase página 187 para información) (véase **video tutorial cuantitativo**).

14. ¿Esperaría que las mitocondrias aisladas sean capaces de llevar a cabo la oxidación de la glucosa acompañada de la producción de ATP? ¿Por qué o por qué no? ¿Podría ser un buen compuesto para agregar a una preparación de mitocondrias aisladas para lograr la síntesis de ATP?
15. Calcule la energía libre liberada cuando el $FADH_2$ se oxida por el $O_2$ molecular en condiciones estándares.
16. Teniendo en cuenta su comprensión acerca de la organización de la mitocondria y cómo genera ATP, responda las siguientes preguntas. Enuncie una breve explicación de cada respuesta.
    *a*) ¿Cuál sería el efecto sobre la producción de ATP al agregar una sustancia (protonófora) que hace a la membrana mitocondrial permeable a los protones?
    *b*) ¿Cuál sería el efecto sobre el pH de la matriz mitocondrial al reducir el suministro de oxígeno?
    *c*) Suponga que el suministro de glucosa a la célula se reduce en gran medida. ¿Cuál sería el efecto en la producción del $CO_2$ por las mitocondrias?
17. Suponga que puede manipular el potencial de la membrana interna de una mitocondria aislada. Usted mide el pH de la matriz mitocondrial y encuentra que es de 8.0. Usted mide la solución baño y descubre que su pH es de 7.0. Usted ajusta el potencial de membrana interna a 59 mV, es decir, la fuerza de la matriz es positiva en 59 mV con respecto al medio de baño. En estas circunstancias, ¿la mitocondria puede usar el gradiente de protón para conducir la síntesis de ATP? Explique su respuesta sobre la base de la fuerza motriz del protón (véase “sección 5.6” para revisar).
18. Suponga que pudiera sintetizar una ATP sintasa que estaba desprovista de la subunidad $\gamma$. ¿Cómo serían los sitios catalíticos de las subunidades $\gamma$ de tal enzima si se comparan entre sí? ¿Por qué?
19. En términos funcionales, la ATP sintasa se puede dividir en dos partes: un “estator” compuesto por subunidades que no se mueven durante la catálisis y un “rotor” compuesto por partes que se mueven. ¿Cuáles subunidades de la enzima componen cada una de estas dos partes? ¿Cómo son las partes inmóviles del estator en $F_o$ relacionadas de forma estructural a las partes inmóviles del estator en $F_1$?

CAPÍTULO 6

# La fotosíntesis y los cloroplastos

## BIOCOMBUSTIBLE: RODANDO TU AUTO GRACIAS A LA FOTOSÍNTESIS

Usamos combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas) para la gran mayoría de nuestras necesidades energéticas. Pero el suministro de combustible fósil es finito y se está acabando. Las nuevas tecnologías de la minería y la extracción, como la estimulación hidráulica, permiten que se extraiga más combustible del suelo, pero todavía hay un límite para lo que está disponible. Mientras tanto, el sol baña todo nuestro planeta con su energía. En la actualidad recolectamos una fracción minúscula de esta luz usando paneles solares, pero estos son caros e ineficientes. Mientras tanto, las plantas, las algas y las bacterias han estado convirtiendo la luz en energía química durante más de 1 000 millones de años, y es su biomasa sobrante enterrada bajo tierra lo que dio origen a los combustibles fósiles que quemamos hoy. ¿Qué pasaría si pudiéramos aprovechar estos organismos para producir combustible? Nadie ha encontrado una forma de producir biocombustible (combustible derivado de organismos vivos) a un precio que pueda competir con los combustibles fósiles. Sin embargo, la promesa de tales biocombustibles ha provocado un intenso esfuerzo de investigación y desarrollo. En este capítulo veremos cómo las plantas convierten la luz del sol en energía química para apoyar su propio crecimiento y metabolismo.



FUENTE: Pierre Marchal /LookatSciences / Phototake

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


6.1 El origen de la fotosíntesis
6.2 Estructura del cloroplasto
6.3 Una descripción del metabolismo fotosintético
6.4 La absorción de luz
6.5 Coordinar la acción de dos sistemas fotosintéticos diferentes
6.6 Las operaciones del fotosistema II y el fotosistema I
6.7 Una descripción general del transporte fotosintético de electrones
6.8 Fotofosforilación
6.9 Síntesis de carbohidratos en plantas $C_3$
6.10 Síntesis de carbohidratos en plantas $C_4$ y plantas CAM
6.11 PERSPECTIVA HUMANA: Calentamiento global y secuestro de carbono

## 6.1 El origen de la fotosíntesis



Las formas de vida más antiguas de la Tierra deben haber obtenido sus materias primas y energía a partir de moléculas orgánicas simples disueltas en su entorno acuoso. Estas moléculas orgánicas debieron formarse *abióticamente*, es decir, como resultado de reacciones químicas no biológicas que ocurrieron en los mares primitivos. Por tanto, de la misma manera como sobrevivimos con nutrientes tomados de nuestro medio ambiente, así también debieron haberlo hecho las formas de vida originales. Los organismos que dependen de una fuente externa de compuestos orgánicos se llaman **heterótrofos**.

El número de organismos heterotróficos que vivieron en la Tierra primitiva debió haber sido severamente restringido ya que la producción espontánea de moléculas orgánicas ocurre de forma muy lenta. La evolución de la vida en la Tierra recibió un tremendo impulso con la aparición de organismos que emplearon una nueva estrategia metabólica. A diferencia de sus predecesores, estos organismos podían fabricar sus propios nutrientes orgánicos a partir de los tipos más simples de moléculas inorgánicas, como el dióxido de carbono ($CO_2$) y el sulfuro de hidrógeno ($H_2S$). Los organismos capaces de sobrevivir con $CO_2$ como su principal fuente de carbono se llaman **autótrofos**.

La fabricación de moléculas orgánicas complejas a partir de $CO_2$ requiere la entrada de grandes cantidades de energía. En el transcurso de la evolución, han cambiado dos tipos principales de autótrofos que pueden distinguirse por su fuente de energía. Los **quimioautótrofos** utilizan la energía química almacenada en moléculas inorgánicas (como amoniaco, sulfuro de hidrógeno o nitritos) para convertir el $CO_2$ en compuestos orgánicos, mientras que los **fotoautótrofos** utilizan la energía radiante del sol para lograr este resultado. Debido a que todos los quimioautótrofos son procariotas, y su contribución relativa a la formación de biomasa en la Tierra es pequeña, no tendremos en cuenta sus funciones metabólicas. Los fotoautótrofos, por otro lado, son responsables de capturar la energía que alimenta las actividades de la mayoría de los organismos en la Tierra. Los fotoautótrofos incluyen plantas y algas eucariotas, varios protistas flagelados y miembros de varios grupos de procariotas. Todos estos organismos llevan a cabo la **fotosíntesis**, un proceso en el que la energía de la luz solar se transforma en energía química que se almacena en carbohidratos y otras moléculas orgánicas.

Durante la fotosíntesis, los electrones de energía relativamente baja se eliminan de un compuesto donador y se convierten en electrones de alta energía utilizando la energía absorbida de la luz.[1] Estos electrones de alta energía se emplean luego en la síntesis de moléculas biológicas reducidas, como almidón y aceites. Es probable que los primeros grupos de fotoautótrofos, que pudieron haber dominado la Tierra durante 2 000 millones de años, utilizaran sulfuro de hidrógeno como fuente de electrones para la fotosíntesis, llevando a cabo la reacción general

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + 2\,S$$

donde ($CH_2O$) representa una unidad de carbohidrato. Numerosas bacterias de las que existen en la actualidad llevan a cabo este tipo de fotosíntesis; un ejemplo se muestra en la **FIGURA 6-1**. Pero hoy en día el sulfuro de hidrógeno no es abundante ni generalizado; en consecuencia, los organismos que dependen de este compuesto como fuente de electrones están restringidos a hábitats como manantiales de azufre y respiraderos de aguas profundas.

Hace cerca de 2 700 a 2 400 millones de años apareció en la Tierra un nuevo tipo de procariota fotosintético que podía utilizar una fuente de electrones mucho más abundante: el agua. El uso del agua no solo permitió que estos organismos —las cianobacterias— explotaran una gama mucho más diversa de hábitats en la Tierra (véase figura 1-15), sino que generó un producto de desecho de enormes consecuencias para todas las formas de vida. Ese producto de desecho fue oxígeno molecular ($O_2$), que se forma a partir de la reacción general.

[1] Véase la nota al pie de la página 173 con respecto al uso del término electrones de alta energía.

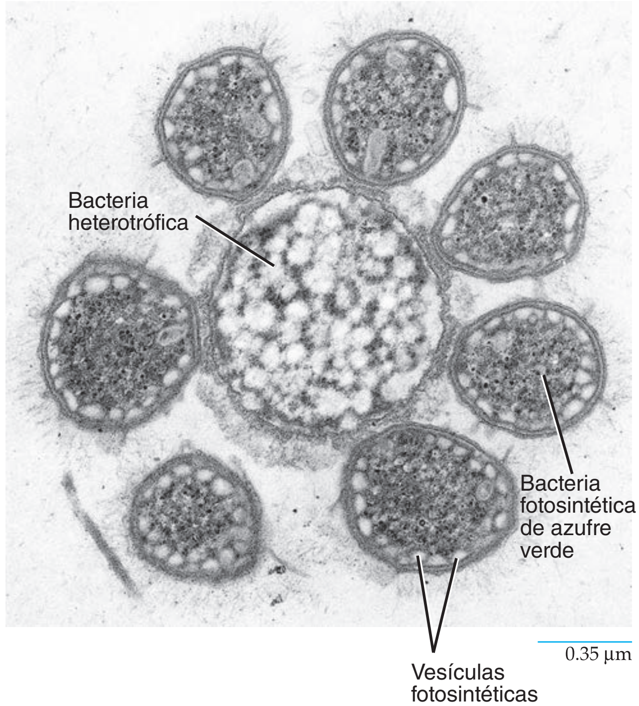



**FIGURA 6-1 Las bacterias fotosintéticas de azufre verde** están presentes como un anillo de células periféricas que viven en una relación simbiótica con una sola bacteria anaeróbica heterotrófica en el centro de la "colonia". La bacteria heterotrófica recibe materia orgánica producida por los simbiontes fotosintéticos. Las vesículas fotosintéticas que contienen la maquinaria de captura de luz son visibles en las bacterias verdes de azufre.

FUENTE: Micrografía electrónica por Ken Clarke, Ceh-Windermere, U.K. © 2002. Reimpresa con permiso de AAAS. Tomada de Tom Fenchel, *Science* 296:1070, 2002.

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + O_2$$

El cambio de $H_2S$ a $H_2O$ como sustrato para la fotosíntesis es más difícil que cambiar una letra en el alfabeto por otra. El potencial redox de la pareja S-$H_2S$ es de 0.25 V en comparación con +0.816 V para la pareja $O_2$-$H_2O$ (página 179). En otras palabras, el átomo de azufre en una molécula de $H_2S$ tiene mucha menos afinidad por sus electrones (y por tanto es más fácil de oxidar) que el átomo de oxígeno en una molécula de $H_2O$. Por tanto, si un organismo va a realizar una fotosíntesis *oxigénica* (liberadora de oxígeno), tiene que generar un agente oxidante muy fuerte como parte de su metabolismo fotosintético para extraer del agua los electrones fuertemente retenidos. El cambio de $H_2S$ (u otros sustratos reducidos) a $H_2O$ como fuente de electrones para la fotosíntesis requirió una maquinaria fotosintética.

En algún momento, una de estas antiguas cianobacterias productoras de $O_2$ se instaló dentro de una célula eucariótica primitiva, no fotosintética, y que contenía mitocondrias (página 27). Durante un largo periodo de evolución, la cianobacteria simbiótica se transformó, de un organismo separado que vivía dentro de una célula huésped, en un organelo citoplásmico, el **cloroplasto**. A medida que el cloroplasto evolucionó, la mayoría de los genes que estaban originalmente presentes en la cianobacteria simbiótica se perdieron o se transfirieron al núcleo de la célula vegetal. Como resultado, los polipéptidos encontrados en los modernos cloroplastos están codificados tanto por genomas nucleares como por genomas de los cloroplastos. Los extensos análisis genéticos

de los genomas de cloroplastos sugieren que todos los cloroplastos modernos han surgido de una única relación simbiótica antigua. Como resultado de su ancestro común, los cloroplastos y las cianobacterias comparten muchas características básicas, incluida una maquinaria fotosintética similar, que será analizada detalladamente en las siguientes secciones.

**REPASO**

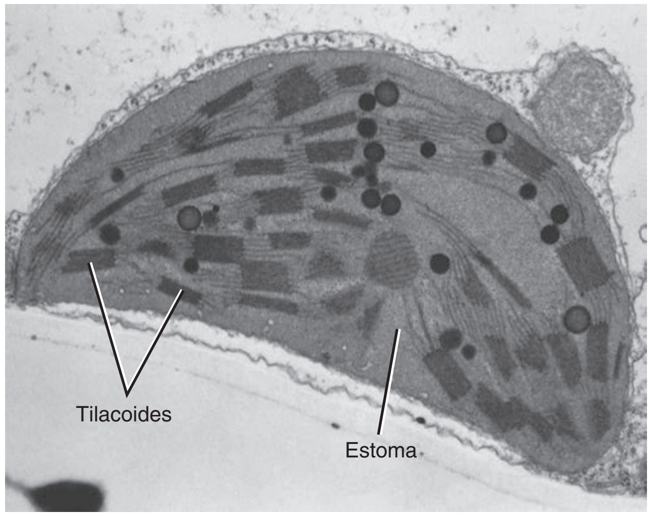
1. Describa el efecto que se cree que tuvo la evolución de las cianobacterias en el metabolismo de los organismos.

## 6.2 Estructura del cloroplasto

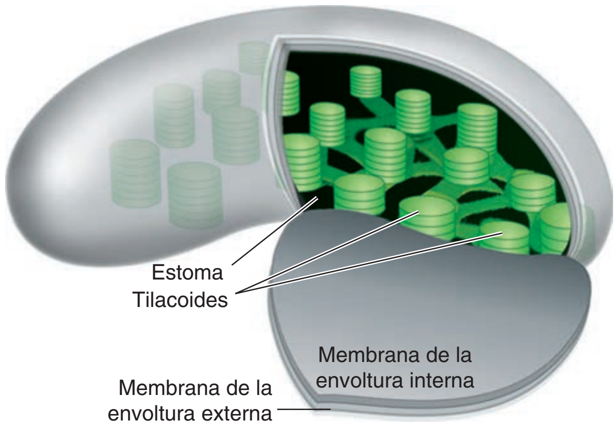
Los cloroplastos se encuentran predominantemente en las células del tejido mesófilo de las hojas. La estructura de una hoja y la disposición de los cloroplastos alrededor de la vacuola central de una célula del tejido mesófilo se muestran en la **FIGURA 6-2**. Los cloroplastos de las plantas superiores generalmente tienen forma de lente (**FIGURA 6-3*a***), con una dimensión aproximada de 2-4 μm de ancho y de 5-10 μm de largo; normalmente suelen ser entre 20-40 por célula. Sus dimensiones hacen que los cloroplastos sean gigantes en comparación con el resto de los organelos —tan grandes como un glóbulo rojo completo de un mamífero—. Como se ilustra en la micrografía del principio del capítulo, los cloroplastos surgen por fisión de cloroplastos preexistentes (o sus precursores no pigmentados, que se denominan **proplastidios**).

Los cloroplastos fueron identificados como el sitio donde se produce la fotosíntesis en 1881, en un ingenioso experimento realizado por el biólogo alemán T. Engelmann, quien iluminó las células del alga verde *Spirogyra* y descubrió que las bacterias que se movían activamente se reunirían fuera de la célula, cerca del sitio del cloroplasto grande en forma de cinta (véase figura 1-5). Las bacterias estaban utilizando para su respiración aeróbica las cantidades mínimas de oxígeno liberadas por el cloroplasto durante la fotosíntesis.

La cubierta exterior de un cloroplasto consiste en una envoltura compuesta de dos membranas separadas por un espacio estrecho (figura 6-3*b*). Al igual que la membrana externa de una mitocondria, la membrana externa de una envoltura de cloroplasto contiene varias porinas diferentes (página 172). Aunque estas proteínas tienen canales relativamente grandes, exhiben cierta selectividad hacia diversos solutos y, por tanto, pueden no ser tan libremente permeables a metabolitos clave como a menudo se describe. La membrana interna de la envoltura es altamente impermeable; las sustancias que se mueven a través de esta membrana lo hacen solo con ayuda de una variedad de transportadores.




*a*)




*b*)

**FIGURA 6-3 Estructura interna de un cloroplasto.** *a*) Micrografía de transmisión de un electrón a través de un solo cloroplasto. La membrana interna está ordenada en montones apilados (grana) de tilacoides en forma de disco que están separados físicamente de la doble membrana exterior que forma la envoltura. *b*) Diagrama esquemático de un cloroplasto que muestra la membrana doble externa y las membranas tilacoides.
FUENTE: Biology Pics/Photo Researchers, Inc.

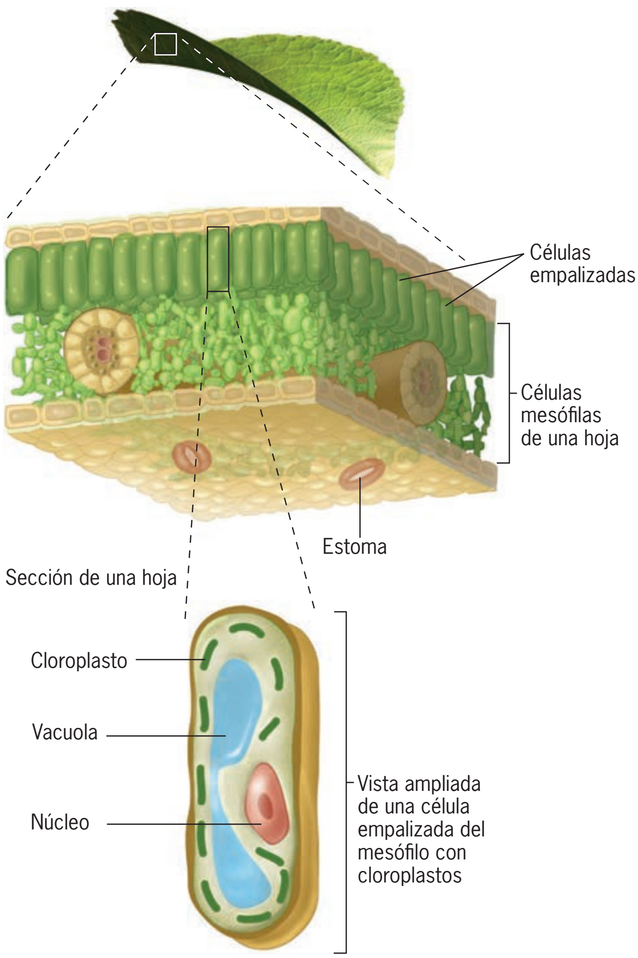
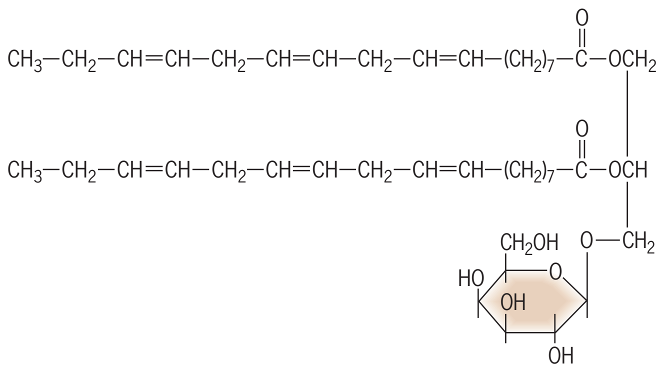



**FIGURA 6-2 Organización funcional de una hoja.** La sección de la hoja muestra varias capas de células que contienen cloroplastos distribuidos dentro de su citoplasma. Estos cloroplastos llevan a cabo la fotosíntesis, proporcionando materias primas y energía química para toda la planta.

Gran parte de la maquinaria fotosintética del cloroplasto —incluidos los pigmentos absorbentes de luz, una cadena compleja de transportadores de electrones y un aparato sintetizador de ATP— es parte de un sistema interno de membrana que está físicamente separado de la envoltura de doble capa. La membrana interna del cloroplasto está organizada en sacos membranosos aplanados llamados **tilacoides**. Estos están dispuestos en pilas ordenadas llamadas **grana** (figuras 6-3*b* y **6-4**). El espacio dentro de un saco de tilacoides es el *lumen*, y el espacio fuera del tilacoide y dentro de la envoltura del cloroplasto es el **estroma**, que contiene las enzimas responsables de la síntesis de carbohidratos. La membrana tilacoide contiene las moléculas de clorofila y los complejos proteicos que componen la maquinaria de transporte de energía del cloroplasto.

Al igual que la matriz de una mitocondria, el estroma de un cloroplasto contiene moléculas de DNA pequeñas, circulares y de doble cadena, y ribosomas semejantes a las procariotas. Como se analizó anteriormente, el DNA del cloroplasto es una reliquia del genoma de un antiguo endosimbionte bacteriano. Dependiendo del organismo, el DNA del cloroplasto contiene entre aproximadamente 60 y 200 genes implicados tanto en la expresión del gen (p. ej., tRNA, rRNA, proteínas ribosómicas) como en la fotosíntesis. La gran mayoría de los 2 000-3 500 polipéptidos estimados en un cloroplasto vegetal están codificados por el DNA del núcleo y se sintetizan en el citosol. Estas proteínas deben ser importadas al cloroplasto mediante una maquinaria de transporte especializada (sección 8.21).

Las membranas tilacoides tienen un alto contenido de proteína y son inusuales en cuanto a tener relativamente poco fosfolípido. En cambio, estas membranas tienen un alto porcentaje de glucolípidos que contienen galactosa, como los siguientes:



Monogalactosil diacilglicerol

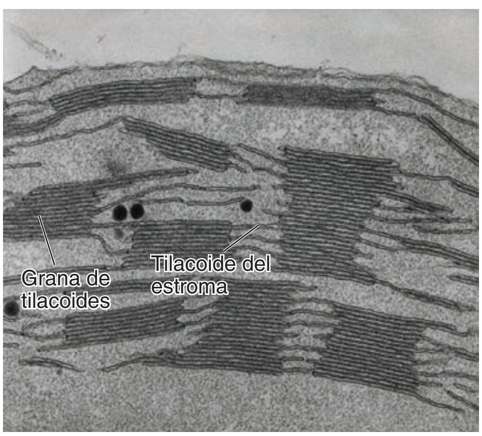



**FIGURA 6-4 Membranas tilacoides.** Microfotografía electrónica de una sección a través de una porción de un cloroplasto que muestra los granos de tilacoides apilados, que están conectados entre sí por tilacoides del estroma no apilados (o laminillas del estroma). Las esferas oscuras son gránulos lipídicos teñidos con osmio.

FUENTE: Dr. Kenneth R. Miller/Photo Researchers, Inc.

Los dos ácidos grasos de estos lípidos contienen varios enlaces dobles, lo que hace que la bicapa lipídica de las membranas tilacoides sea muy fluida. La fluidez de la bicapa lipídica facilita la difusión lateral de los complejos proteicos a través de la membrana durante la fotosíntesis.

**REPASO**

1. Describa la organización de las membranas de un cloroplasto. ¿En qué se diferencia esta organización de la de las mitocondrias?
2. Establezca las diferencias entre estroma y lumen, envoltura de membrana y membrana tilacoide, autótrofos y heterótrofos.

## 6.3 Una descripción del metabolismo fotosintético

Un avance importante para nuestra comprensión de las reacciones químicas de la fotosíntesis se produjo a principios de la década de 1930 con una propuesta de C. B. van Niel, quien en ese momento era un estudiante graduado en la Universidad de Stanford. Considere la ecuación general de la fotosíntesis como se indicó anteriormente:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + O_2$$

La creencia predominante en 1930 era que la energía de la luz se usaba para dividir el $CO_2$, liberando oxígeno molecular ($O_2$) y transfiriendo el átomo de carbono a una molécula de agua para formar una unidad de carbohidrato ($CH_2O$). En 1931, Van Niel propuso un mecanismo alternativo basado en su trabajo con las bacterias del azufre. Se había demostrado que estos organismos podían reducir el $CO_2$ a carbohidratos utilizando la energía de la luz sin la producción simultánea de $O_2$ molecular. La reacción propuesta para las bacterias de azufre era

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$$

Postulando una similitud básica en los procesos fotosintéticos de todos los organismos,Van Niel propuso una reacción general para incluir todas estas actividades:

$$CO_2 + 2\,H_2A \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,A$$

Para la producción de una hexosa, como la glucosa, la reacción sería

$$6\,CO_2 + 12\,H_2A \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O + 12\,A$$

Van Niel reconoció que la fotosíntesis era esencialmente un proceso de oxidación-reducción. En la reacción anterior, $H_2A$ es un donante de electrones (agente reductor) y puede representarse por $H_2O$, $H_2S$ u otros sustratos reducidos utilizados por diversos tipos de bacterias. El dióxido de carbono, sin embargo, es un agente oxidante que, en una célula vegetal, se reduce para formar hexosa en la siguiente reacción:

$$6\,CO_2 + 12\,H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O + 6\,O_2$$

En este esquema, cada molécula de oxígeno se deriva no del $CO_2$, sino de la descomposición de dos moléculas de $H_2O$, un proceso impulsado por la absorción de la luz. El papel del agua en la formación de oxígeno molecular fue establecido claramente en 1941 por Samuel Ruben y Martin Kamen de la Universidad

de California, Berkeley. Estos investigadores llevaron a cabo experimentos con suspensiones de algas verdes utilizando un isótopo especialmente marcado de oxígeno, $^{18}O$, como reemplazo del isótopo común $^{16}O$. Una muestra de algas se expuso a C [$^{18}O_2$] marcado y agua no marcada, mientras que otra muestra se expuso a dióxido de carbono sin marcar y agua marcada $H_2[^{18}O]$. Los investigadores hicieron una pregunta simple: ¿cuál de estas dos muestras de organismos fotosintéticos liberó $^{18}O_2$ marcado? Las algas que recibieron agua marcada produjeron oxígeno marcado, lo que demuestra que el $O_2$ producido durante la fotosíntesis se deriva del $H_2O$. Las algas que recibieron dióxido de carbono marcado produjeron oxígeno no marcado, lo que confirma que el $O_2$ no se producía por una división química del $CO_2$. Contrario a la creencia popular, no fue el dióxido de carbono el que se dividió en sus dos componentes atómicos, sino el agua. La hipótesis de Van Niel había sido confirmada.

La propuesta de Van Niel colocó la fotosíntesis en una perspectiva diferente; se convirtió, en esencia, en el reverso de la respiración mitocondrial. Mientras que la respiración en las mitocondrias reduce el oxígeno a agua, la fotosíntesis en los cloroplastos oxida el agua a oxígeno. Aquel proceso libera energía, por tanto este proceso debe requerir energía. Una visión general de la termodinámica de la fotosíntesis y la respiración aeróbica se ofrece en la **FIGURA 6-5**. Muchas similitudes entre estas dos actividades metabólicas serán evidentes en las siguientes páginas.

Los eventos de la fotosíntesis se pueden dividir en dos series de reacciones. Durante la primera etapa, las **reacciones dependientes de la luz**: la energía de la luz solar se absorbe y se almacena como energía química en dos moléculas biológicas clave: el ATP y la NADPH. Como se analizó en el capítulo 3, el ATP es la principal fuente de energía química de la célula, y la NADPH es su principal fuente de energía reductora. Durante la segunda etapa, las **reacciones independientes de la luz** (o "reacciones oscuras", como a menudo se les llama), los carbohidratos se sintetizan a partir del dióxido de carbono utilizando la energía almacenada en las moléculas de ATP y NADPH producidas en las reacciones dependientes de la luz. De hecho, estas "reacciones oscuras" ocurren mucho más rápidamente cuando también están sucediendo las reacciones dependientes de la luz (véase página 216). Se estima que cada año la vida vegetal en la Tierra convierte alrededor de 500 trillones de kg de $CO_2$ en carbohidratos, una cantidad aproximadamente 10 000 veces mayor que la producción mundial de carne de res.

Comenzaremos con las reacciones dependientes de la luz, las cuales son complejas y cuya comprensión permanece incompleta.

**REPASO**

1. ¿De qué manera la fotosíntesis es inversa a la respiración?
2. ¿En qué se asemejan la fotosíntesis no oxigenada que usa $H_2S$ como una fuente de electrones y la fotosíntesis oxigénica que usa H2O como fuente de electrones? ¿En qué se diferencian?
3. En términos generales, ¿cómo difieren las reacciones independientes de la luz de las reacciones dependientes de la luz? ¿Cuáles son los productos principales de ambos tipos de reacciones?

## 6.4 La absorción de la luz

La luz viaja en paquetes (o cuantos) de energía llamados fotones, que se pueden considerar como "partículas" de luz.[2] El contenido de energía de un fotón depende de la longitud de onda de la luz de acuerdo con la ecuación:

$$E = hc/\lambda$$

donde $h$ es la constante de Planck ($1.58 \times 10^{-34}$ cal · s), $c$ es la velocidad de la luz en el vacío, y $\lambda$ es la longitud de onda de la luz. Cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor será el contenido de energía. Un mol ($6.02 \times 10^{23}$) de fotones de 680 nm de longitud de onda, que es una longitud de onda importante en la fotosíntesis, contiene aproximadamente 42 kcal de energía, lo que equivale a un cambio en el potencial redox de aproximada-

[2] La noción de que las radiaciones electromagnéticas (p. ej., la luz) tienen propiedades tanto ondulatorias como corpusculares surgió a inicios del siglo XX, gracias a los trabajos de Plank, Broglie y Einstein, y marcó el inicio de los estudios de la mecánica cuántica.

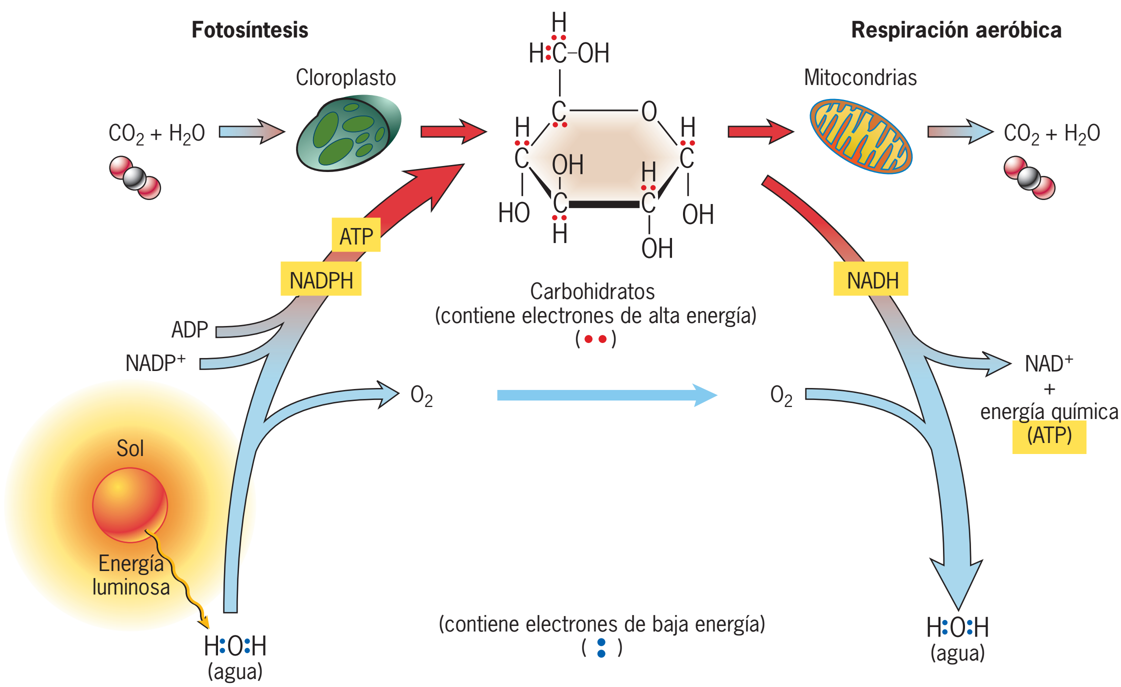



**FIGURA 6-5 Visión general de la energética de la fotosíntesis y la respiración aeróbica.**

mente 1.8 V (calculado dividiendo 42 kcal entre la constante de Faraday de 23.06 kcal/V).

La absorción de la luz es el primer paso en cualquier proceso fotoquímico. Cuando un fotón es absorbido por una molécula, un electrón se vuelve lo suficientemente energético como para ser empujado desde un orbital interno al externo. Se dice entonces que la molécula ha cambiado de un **estado basal** a un **estado excitado**. Debido a que el número de orbitales en el que puede existir un electrón es limitado y cada orbital tiene un nivel de energía específico, se deduce que cualquier átomo o molécula dado solo puede absorber la luz de ciertas longitudes de onda específicas.

El estado excitado de una molécula es inestable y se puede esperar que dure solo alrededor de $10^{-9}$ segundos. Un electrón excitado puede experimentar varias consecuencias, dependiendo de las circunstancias. Considere una molécula de **clorofila**, que es el pigmento fotosintético absorbente de luz más importante. Si el electrón de una molécula de clorofila excitada cae de nuevo a un orbital inferior, debe liberarse la energía que había absorbido. Si la energía se libera en forma de luz (fluorescencia o fosforescencia) o calor, la clorofila ha vuelto al estado basal original y no se ha utilizado la energía del fotón absorbido. Esto es precisamente lo que se observa cuando se ilumina una preparación de *clorofila aislada* en solución: la solución se vuelve fuertemente fluorescente porque la energía absorbida se reemite a una longitud de onda más larga (es decir, de menor energía). Sin embargo, si se realiza el mismo experimento en una preparación de *cloroplastos aislados* solo se observa una débil fluorescencia, lo que indica que se disipa muy poca energía absorbida. En cambio, los electrones excitados de las moléculas de clorofila se transfieren a aceptores de electrones dentro de las membranas de cloroplastos antes de que tengan la oportunidad de regresar a orbitales energéticos más bajos. Por tanto, los cloroplastos son capaces de aprovechar la energía absorbida antes de que se disipe.

Los **pigmentos** son compuestos que parecen coloreados porque solo absorben luz de una longitud de onda particular dentro del espectro visible. Las hojas son verdes porque sus cloroplastos contienen grandes cantidades del pigmento clorofila, los cuales absorben más fuertemente en el azul y el rojo, dejando que las longitudes de onda verdes intermedias se reflejen en nuestros ojos. La estructura de la clorofila se muestra en figura 6-6. Cada molécula consta de dos partes: 1) un anillo de porfirina que funciona en la absorción de la luz y 2) una cadena de fitol hidrofóbico que mantiene la clorofila incrustada en la membrana fotosintética. A diferencia de las porfirinas rojas que contienen hierro (grupos hem) de la hemoglobina y la mioglobina, la porfirina en una molécula de clorofila contiene un átomo de magnesio. Los enlaces simples y dobles alternados a lo largo del borde del anillo de porfirina descoloca los electrones, y estos forman una nube alrededor del anillo (figura 6-6). Se dice que los sistemas de este tipo están *conjugados* y son fuertes absorbentes de luz visible. La energía absorbida provoca una redistribución de la densidad electrónica de la molécula, lo que a su vez favorece la pérdida de un electrón hacia un aceptor adecuado. El sistema de enlace conjugado también amplía los picos de absorción, permitiendo que las moléculas individuales absorban energía de un rango de longitudes de onda. Estas características son evidentes en un espectro de absorción de moléculas de clorofila purificadas (**FIGURA 6-7**). Un **espectro de absorción** es un gráfico de la intensidad de la luz absorbida en relación con su longitud de onda. El rango de longitudes de onda absorbidas por los pigmentos fotosintéticos situados dentro de los tilacoides se incrementa adicionalmente debido a que los pigmentos están asociados de forma no covalente con una variedad de diferentes polipéptidos.

Varias clases de clorofila, que difieren entre sí en los grupos laterales unidos al anillo de porfirina, se producen entre los organismos fotosintéticos. Las estructuras de estos pigmentos se indican en la figura 6-6. Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos primarios que absorben la luz, pero las plantas terrestres

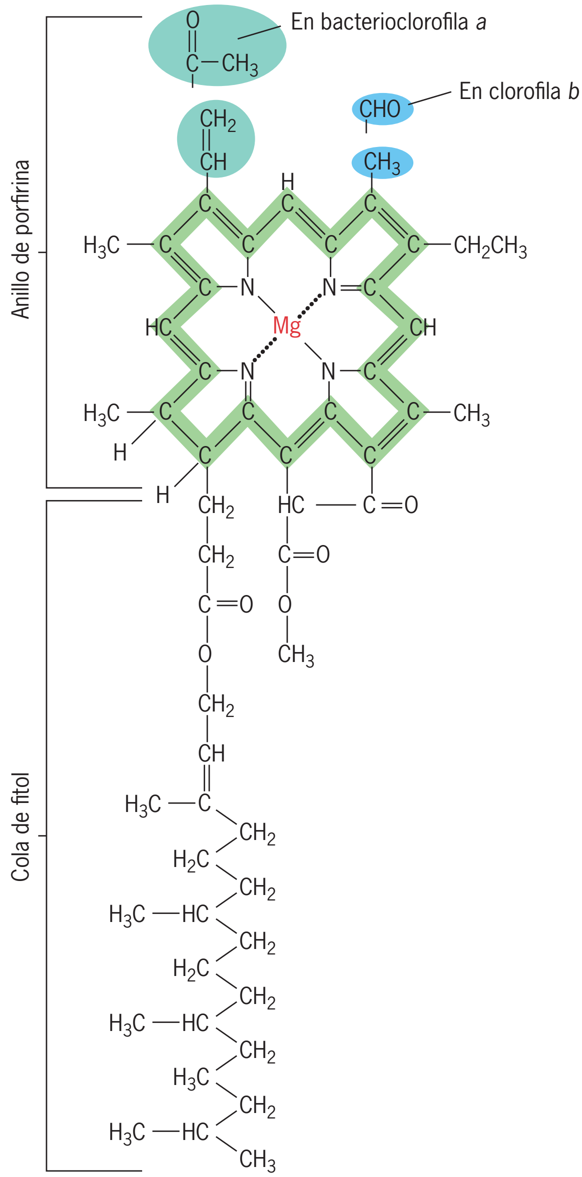
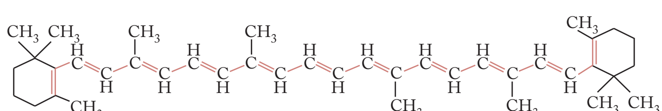



**FIGURA 6-6 Estructura de la clorofila *a*.** La molécula consiste en un anillo de porfirina (que a su vez está formado por cuatro anillos de pirrol más pequeños) con un ion de magnesio en su centro y una larga cola de hidrocarburo. El sombreado verde alrededor del borde de la porfirina indica la deslocalización de los electrones que forman una nube. La estructura de la porfirina —que contiene magnesio— de la clorofila se puede comparar con la porfirina que contiene hierro de un hem que se muestra en la figura 5-12. La clorofila *b* y la bacterioclorofila *a* contienen sustituciones específicas y como se indica. Por ejemplo, el grupo —$CH_3$ en el anillo II es reemplazado por un grupo —CHO en la clorofila *b*. La clorofila *a* está presente en todos los organismos fotosintéticos productores de oxígeno, pero está ausente en las diversas bacterias del azufre. Además de la clorofila *a*, la clorofila *b* está presente en todas las plantas superiores y en las algas verdes. Otros tipos no mostrados son la clorofila *c*, presente en algas pardas, diatomeas y en ciertos protozoos; y la clorofila *d*, que se encuentra en algas rojas. La bacterioclorofila se encuentra solo en bacterias verdes y moradas, organismos que no producen $O_2$ durante la fotosíntesis.

también contienen pigmentos accesorios anaranjados y rojos llamados *carotenoides*, incluido el betacaroteno, que contienen un sistema lineal de dobles enlaces conjugados:



Betacaroteno

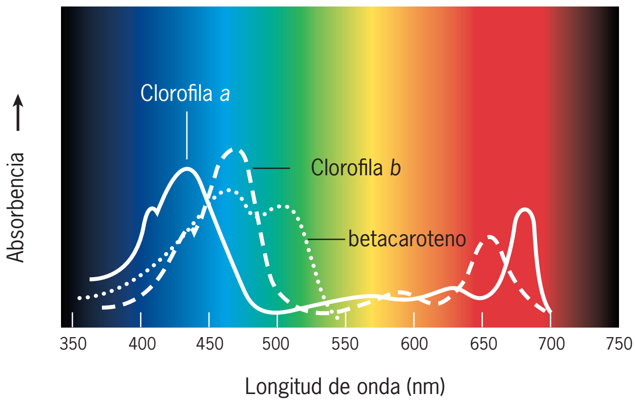



**FIGURA 6-7 Espectro de absorción para varios pigmentos fotosintéticos de plantas superiores.** El fondo muestra los colores que percibimos para las longitudes de onda del espectro visible. Las clorofilas absorben más fuertemente de las regiones violeta, azul y roja del espectro, mientras que los carotenoides (p. ej., el betacaroteno) también absorben de la región verde. Las algas rojas y las cianobacterias contienen pigmentos adicionales (ficobilinas) que absorben en las bandas medias del espectro.

Los carotenoides absorben luz principalmente de la región azul y verde del espectro (figura 6-7), mientras que reflejan los de las regiones amarilla, naranja y roja. Los carotenoides producen los colores característicos de las zanahorias y las naranjas, y de las hojas de algunas plantas durante el otoño. Los carotenoides tienen múltiples funciones: actúan como colectores de luz secundarios durante la fotosíntesis, y extraen el exceso de energía de las moléculas de clorofila excitadas y lo disipan en forma de calor. Si este exceso de energía no fuera absorbido por los carotenoides, podría transferirse al oxígeno, produciendo una forma ultrarreactiva de la molécula llamada oxígeno de camiseta ($^1O_2$) que puede destruir las moléculas biológicas y causar la muerte celular.

Debido a que la luz que cae sobre una hoja se compone de una variedad de longitudes de onda, la presencia de pigmentos con propiedades de absorción variables asegura que un mayor porcentaje de fotones entrantes estimulará la fotosíntesis. Esto puede verse al examinar un **espectro de acción** (**FIGURA 6-8**), que es un gráfico de la tasa relativa (o eficiencia) de la fotosíntesis producida por la luz de varias longitudes de onda. A diferencia de un espectro de absorción, que simplemente mide las longitudes de onda de la luz que son absorbidas por pigmentos particulares, un espectro de acción identifica las longitudes de onda que son efectivas para producir una respuesta fisiológica dada. El espectro de acción para la fotosíntesis sigue bastante de cerca el espectro de absorción de clorofilas y carotenoides, lo que refleja la participación de estos pigmentos en el proceso fotosintético.

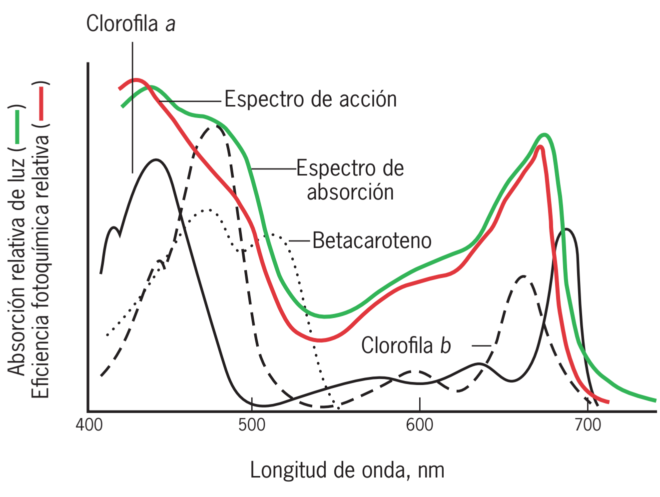



**FIGURA 6-8 Espectro de acción para la fotosíntesis.** El espectro de acción (línea de color rojo) indica la eficiencia relativa con la que la luz de varias longitudes de onda puede promover la fotosíntesis en las hojas de una planta. Se puede generar un espectro de acción midiendo el $O_2$ producido por las hojas después de la exposición a varias longitudes de onda. Las líneas negras indican los espectros de absorción de cada uno de los principales pigmentos fotosintéticos. La línea verde muestra el espectro de absorción combinado de todos los pigmentos.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la diferencia entre un espectro de absorción y un espectro de acción?
2. Compare la estructura, absorción y función de las clorofilas y los carotenoides.

## 6.5 Coordinar la acción de dos sistemas fotosintéticos diferentes

En 1932 Robert Emerson y William Arnold, del Instituto de Tecnología de California, llevaron a cabo un experimento que sugería que no todas las moléculas de clorofila en un cloroplasto estaban directamente involucradas en la conversión de energía luminosa en energía química. Usando suspensiones del alga verde de *Chlorella*, y luces intermitentes de duración extremadamente corta a una intensidad de saturación, determinaron la cantidad mínima de luz necesaria para alcanzar la producción máxima de $O_2$ durante la fotosíntesis. Sobre la base del número de moléculas de clorofila presentes en la preparación, calcularon que una molécula de oxígeno se estaba liberando durante un breve destello de luz por cada una de las 2 500 moléculas de clorofila presentes. Más tarde, Emerson demostró que se deben absorber un mínimo de ocho fotones para producir una molécula de $O_2$, lo que significa que los cloroplastos contienen aproximadamente 300 veces más moléculas de clorofila que las que serían necesarias para oxidar el agua y generar $O_2$.

Una posible interpretación de este hallazgo es que solo un porcentaje muy pequeño de moléculas de clorofila está involucrado en la fotosíntesis. Sin embargo, este no es el caso; por el contrario, varios cientos de moléculas de clorofila actúan juntas como una **unidad fotosintética** en la que solo un miembro del grupo —la **clorofila del centro de reacción**— en realidad transfiere electrones a un aceptor de electrones. Aunque la mayor parte de las moléculas de pigmento no participan *directamente* en la conversión de energía luminosa en energía química, son responsables de la absorción de la luz. Estas moléculas de pigmento forman una **antena** de recolección de luz que absorbe fotones de longitud de onda variable y transfiere esa energía (llamada *energía de excitación*) muy rápidamente a la molécula de pigmento en el centro de reacción.

La transferencia de energía de excitación de una molécula de pigmento a otra es muy sensible a la distancia entre las moléculas. Las moléculas de clorofila de una antena se mantienen muy próximas (menos de 1.5 nm de separación), y con una orientación adecuada mediante enlace no covalente, a la membrana integral de polipéptidos. Una “regla” que opera entre los pigmentos de la antena es que la energía solo se puede transferir a una molécula que requiere menos o igual energía. En otras palabras, la energía solo puede pasar a una molécula de pigmento que absorbe luz de igual o mayor longitud de onda (energía más baja) que la absorbida por la molécula donante. A medida que la energía “deambula” a través de una unidad fotosintética (**FIGURA 6-9**), se transfiere repetidamente a una molécula de pigmento que absorbe en una longitud de onda más larga. La energía se transfiere

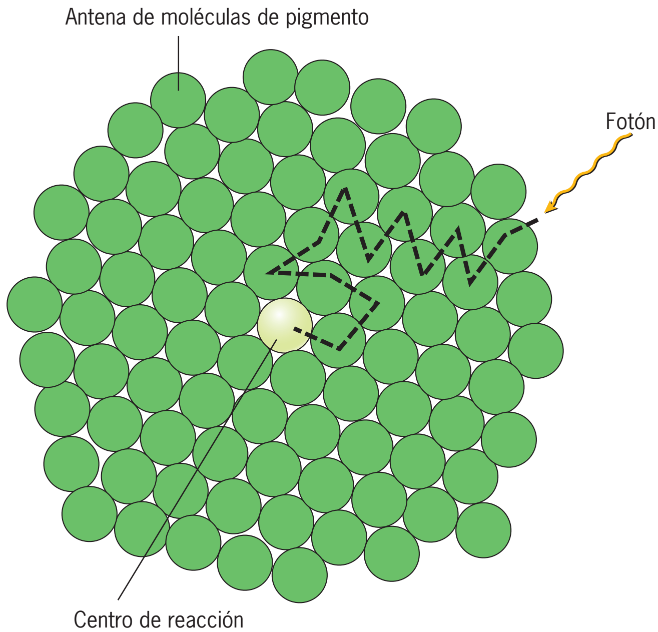



**FIGURA 6-9 Transferencia de energía de excitación.** La energía se transfiere aleatoriamente a través de una red de moléculas de pigmento que absorben luz de longitud de onda cada vez mayor, hasta que la energía alcanza una clorofila del centro de reacción que transfiere un electrón excitado a un aceptor primario, como se describe más adelante en este capítulo.

finalmente a una clorofila del centro de reacción, que absorbe la luz de mayor longitud de onda que cualquiera de sus vecinos. Una vez que el centro de reacción recibe la energía, el electrón excitado por la absorción de luz puede transferirse a su receptor.

La evolución de los organismos capaces de utilizar $H_2O$ como fuente de electrones estuvo acompañada por cambios importantes en la maquinaria fotosintética. La razón de estos cambios se revela al considerar la energía de la fotosíntesis oxigénica (liberadora de $O_2$). El par $O_2$-$H_2O$ tiene un potencial redox estándar de +0.82 V, mientras que el del par $NADP^+$-NADPH es –0.32 V (tabla 5-1). La diferencia entre los potenciales redox de estas dos parejas (1.14 V) proporciona una medida de la energía mínima que debe absorber el sistema para eliminar un electrón del $H_2O$ y pasarlo a $NADP^+$ *en condiciones estándares*. Sin embargo, las células no funcionan en condiciones estándares, y la transferencia de electrones de $H_2O$ a $NADP^+$ requiere más que la entrada mínima de energía. Se estima que, durante las operaciones reales en el cloroplasto, se utilizan más de 2 V de energía para llevar a cabo esta reacción de oxidación-reducción. (Este valor de 2 V se estima a partir de la escala de la izquierda de la figura 6-10, que se extiende desde menos de 1 V a más de 1 V.) En la página 204 se observó que un mol de fotones de 680 nm de longitud de onda (luz roja) es equivalente a un cambio en el potencial redox de 1.8 V. Por tanto, si bien teóricamente es posible que un fotón de luz roja impulse un electrón a un nivel de energía requerido para reducir $NADP^+$ en condiciones estándares (es decir, 1.14 V), el proceso se logra en la célula a través de la acción combinada de dos reacciones diferentes de absorción de luz.

Las reacciones de absorción de luz de la fotosíntesis ocurren en grandes complejos de proteínas de pigmento llamados **fotosistemas**. Se requieren dos tipos de fotosistemas para catalizar

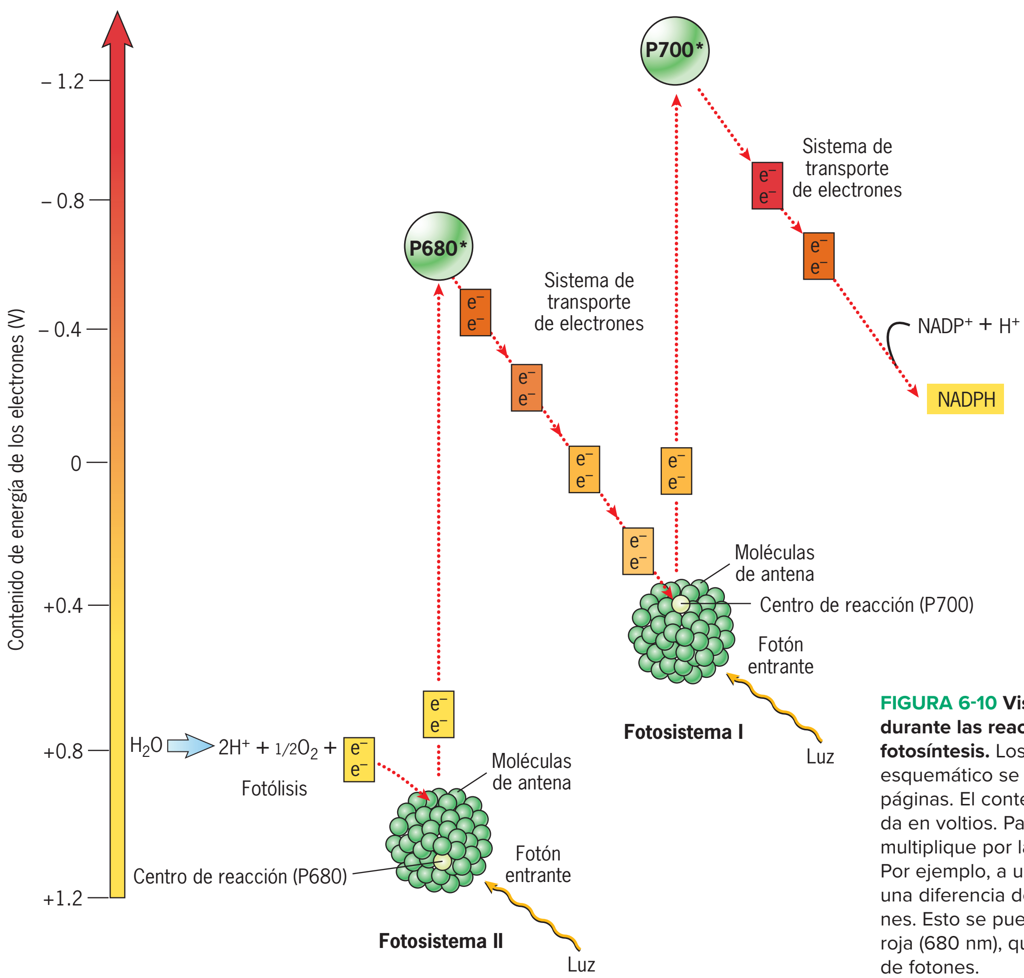



**FIGURA 6-10 Visión general del flujo de electrones durante las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis.** Los eventos representados en este dibujo esquemático se describen en detalle en las siguientes páginas. El contenido de energía de los electrones se da en voltios. Para convertir estos valores en calorías, multiplique por la constante de Faraday, 23.06 kcal/V. Por ejemplo, a una diferencia de 2.0 V corresponde una diferencia de energía de 46 kcal/mol de electrones. Esto se puede comparar con la energía de la luz roja (680 nm), que contiene alrededor de 42 kcal/mol de fotones.

las dos reacciones de absorción de luz utilizadas en la fotosíntesis oxigénica. Un fotosistema, el **fotosistema II** (**PSII,** *photosystem* II), impulsa los electrones desde un nivel de energía por debajo del nivel del agua hasta un punto medio (figura 6-10). El otro fotosistema, **fotosistema I** (**PSI,** *photosystem* I), eleva los electrones desde un punto intermedio a un nivel de energía muy superior al de $NADP^+$. Los dos fotosistemas actúan en serie, es decir, uno después del otro. A pesar de que median reacciones fotoquímicas distintivamente diferentes, los dos tipos de fotosistemas en las plantas, así como los de las células bacterianas fotosintéticas, exhiben marcadas similitudes en la composición de proteínas y en su arquitectura general. Estas propiedades compartidas sugieren que todos los centros de reacción fotosintética han evolucionado a partir de una estructura ancestral común que se ha conservado durante más de 3 000 millones de años.

El centro de reacción del fotosistema II es un dímero de clorofila denominado **P680**, la "P" significa "pigmento", y "680" denota la longitud de onda luminosa que este par específico de clorofilas absorbe con mayor intensidad. El centro de reacción del fotosistema I también es un dímero de clorofila y se denomina **P700** por razones similares. Cuando la luz del sol golpea una membrana de tilacoides, la energía es absorbida por los pigmentos de antena tanto de PSII como de PSI, y pasa a los centros de reacción de ambos fotosistemas. Los electrones de ambos pigmentos del centro de reacción son impulsados a un orbital externo, y cada electrón se transfiere a un **aceptor primario de electrones**. Después de perder sus electrones, las clorofilas del centro de reacción de PSII y PSI se convierten en pigmentos con carga positiva denominados $P680^+$ y $P700^+$, respectivamente. Los aceptores de electrones, a su vez, se cargan negativamente. En esencia, esta separación de carga dentro de los fotosistemas *es* la reacción a la luz: la conversión de energía luminosa en energía química. Los centros de reacción cargados positivamente actúan como atrayentes de electrones, y los aceptores de carga negativa actúan como donantes de electrones. Como consecuencia, la separación de carga dentro de cada fotosistema establece el escenario para el flujo de electrones a lo largo de una cadena de portadores específicos.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la relación entre el contenido de energía de un fotón y la longitud de onda de la luz? ¿Cómo determina la longitud de onda de la luz si estimulará la fotosíntesis? ¿Cómo determinan las propiedades de absorbencia de los pigmentos fotosintéticos la dirección en la que se transfiere la energía dentro de una unidad fotosintética?
2. ¿Cuál es el papel en la fotosíntesis de los pigmentos de la antena de extracción de luz?
3. ¿Cómo llega la energía de los fotones absorbidos por los pigmentos de la antena al centro de reacción?
4. Los fotosistemas I y II impulsan los electrones a una mayor energía en dos pasos diferentes. ¿Cuál de los dos impulsa los electrones desde la energía más baja a un punto medio, y cuál impulsa luego los electrones desde el punto medio hasta el nivel de energía más alto? Si miramos los nombres de los fotosistemas (I y II), ¿su orden numérico corresponde a los dos aumentos sucesivos en la energía de los electrones, o es un orden inverso?

## 6.6 Las operaciones del fotosistema II y el fotosistema I

En la fotosíntesis oxigénica, donde actúan dos fotosistemas en serie, el flujo de electrones se produce a lo largo de tres etapas —desde el agua hasta PSII, desde PSII hasta PSI y desde PSI hasta $NADP^+$— en un arreglo descrito como *esquema Z*. El bosquejo general del esquema Z se ilustra en la figura 6-10; a continuación nos pondremos al corriente sobre los nombres de algunos de los componentes específicos mientras examinamos cada una de las partes principales de esta vía. Al igual que los miembros de la cadena respiratoria de las mitocondrias (capítulo 5), la mayoría de los portadores de electrones del esquema Z se encuentran como parte de grandes complejos proteicos de la membrana (véase figura 6-16). Con los años, los investigadores han generado imágenes cada vez más detalladas de las estructuras de estos complejos. Estos esfuerzos han culminado en los últimos años con la publicación de estructuras de PSI y PSII a una resolución cada vez mayor, obtenidas por varios laboratorios mediante cristalografías de rayos X. Estos estudios forman la base de las estructuras de los fotosistemas que se muestran en las **FIGURAS 6-11**, 6-15 y 6-16.

Al igual que en la mitocondria, la transferencia de electrones libera energía que se utiliza para establecer un gradiente de protones, que a su vez impulsa la síntesis de ATP. Como se analizó en la sección 6.9, el ATP producido en el cloroplasto se usa principalmente dentro del organelo en la síntesis de carbohidratos; el ATP utilizado fuera del cloroplasto se deriva en gran medida del producido en las mitocondrias de células vegetales.

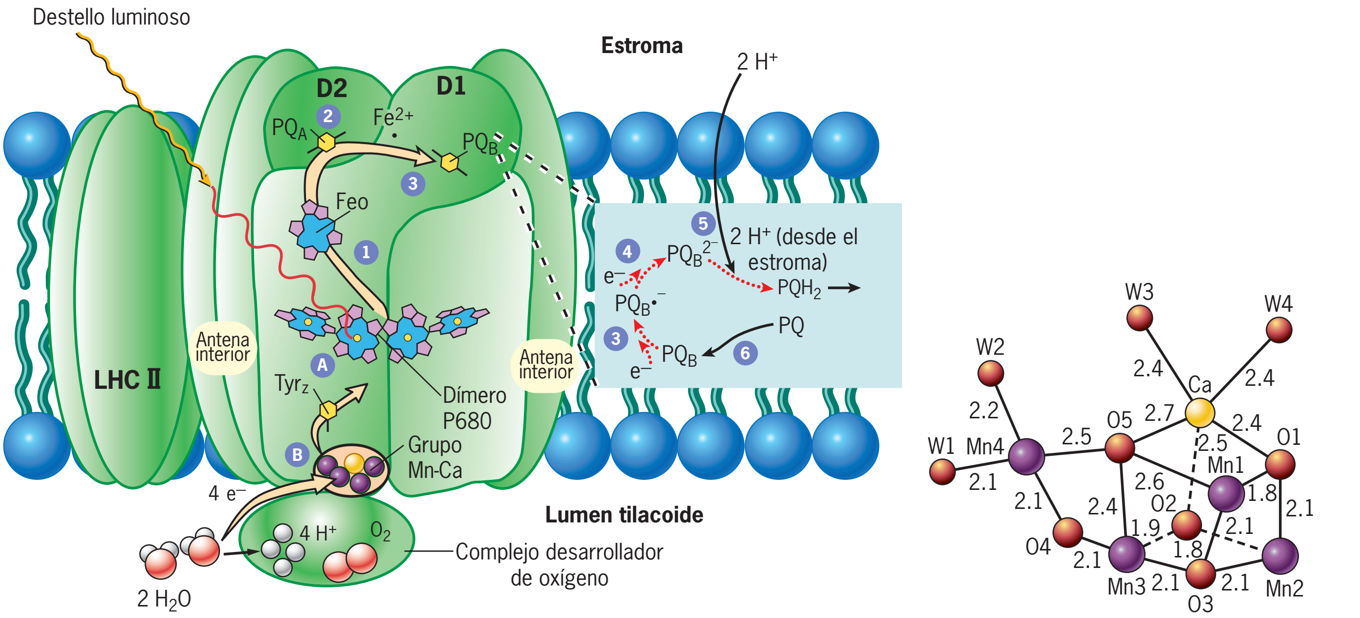
### Operaciones del PSII: obtención de electrones mediante la división del agua

El fotosistema II utiliza energía de la luz absorbida para generar un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide. El PSII de las células vegetales es un complejo de más de 20 polipéptidos diferentes, la mayoría de los cuales están incrustados en la membrana tilacoide. Dos de estas proteínas, designadas como D1 y D2, son particularmente importantes porque juntas unen al dímero de clorofila P680 del centro de reacción y a todos los cofactores implicados en el transporte de electrones a través del fotosistema (figura 6-11).

El primer paso en la activación del PSII es la absorción de luz por un pigmento de antena. La mayoría de los pigmentos de antena que recolectan energía solar para el PSII residen dentro de un complejo de proteínas de pigmento separado, llamado **complejo de recolección de luz II** o, simplemente, **LHCII** (*light-harvesting complex II*). Las proteínas de LHCII se unen tanto a clorofilas como a carotenoides y están situadas fuera del núcleo del fotosistema (figura 6-11*a*).

**EL FLUJO DE ELECTRONES DESDE PSII HASTA LA PLASTOQUINONA** La energía de excitación pasa desde los pigmentos de LHCII del exterior de la antena hasta un pequeño número de moléculas de clorofila del interior de la antena situadas dentro del núcleo de PSII. A partir de ahí, la energía finalmente pasa al centro de reacción PSII. El pigmento del centro de reacción excitado (P680*) responde transfiriendo un solo electrón fotoexcitado a una molécula de feofitina similar a la clorofila estrechamente asociada ("Feo" para abreviar, véase paso 1, figura 6-11*a*), que es el primer aceptor de electrones en toda una serie de pasos de transferencia de electrones. Esta primera transferencia de electrones genera una separación de carga en el PSII entre un donante con carga positiva (P680*) y un aceptor con carga negativa ($Feo^-$).

La importancia de la formación de dos especies cargadas de forma opuesta, $P680^+$ y $Feo^-$, se hace más evidente cuando consideramos las capacidades de oxidación-reducción de estas dos especies. P680+ es deficiente en electrones y por tanto puede aceptarlos, lo que lo convierte en un agente oxidante. Por el contrario, $Feo^-$ tiene un electrón extra que perderá fácilmente, convirtiéndolo en un agente reductor. Este evento —la formación guiada por la luz de un agente oxidante y un agente reductor— lleva menos




*a*) *b*)

**FIGURA 6-11 La organización funcional del fotosistema II.** *a*) Un modelo esquemático del enorme complejo de proteína y pigmento que cataliza la oxidación del agua a través de la luz y la reducción de la plastoquinona. El camino recorrido por los electrones a través del PSII está indicado por las flechas amarillas. Los eventos comienzan con la absorción de la luz por un pigmento de antena en el complejo de recolección de luz externo (LHCII). La energía se transfiere de LHCII a través de un complejo de pigmento-proteína de una antena interna a una clorofila *a* del centro de reacción P680, que es una de las cuatro moléculas de clorofila *a* estrechamente espaciadas (el dímero P680 y dos moléculas accesorias de clorofila *a*). La absorción de esta energía por parte de P680 excita un electrón, que se transfiere a feofitina (Feo) (paso 1), el principal aceptor de electrones del PSII. (La feofitina es una molécula de clorofila que carece del ion $Mg^{2+}$). El electrón pasa posteriormente a una plastoquinona $PQ_A$ (paso 2) y luego a través de $Fe^{2+}$ no hem a $PQ_B$ (paso 3) para formar un radical libre cargado negativamente $PQ_B^{\cdot-}$. La absorción de un segundo fotón envía un segundo electrón a lo largo de la misma vía, convirtiendo el aceptor en $PQ_B^{2-}$ (paso 4). Luego, dos protones entran desde el estroma (paso 5) generando $PQH_2$, que se libera en la bicapa lipídica y se reemplaza por una nueva molécula $PQ_B$ oxidada (paso 6). A medida que se producen los eventos anteriores, los electrones son movidos del $H_2O$ mediante Tyrz hacia el pigmento con carga positiva del centro de reacción (pasos B y A). Por tanto, el PSII cataliza en general la transferencia de electrones del agua a la plastoquinona. La oxidación de dos moléculas de $H_2O$ para liberar una molécula de $O_2$ genera dos moléculas de $PQH_2$. Debido a que la oxidación del agua libera protones en el lumen tilacoide, y la reducción de la $PQ_B^{2-}$ elimina protones del estroma, la operación del PSII contribuye de forma importante a la formación de un gradiente de $H^+$. La figura muestra un monómero de un complejo del PSII dimérico. *b*) El complejo tranformador de oxígeno contiene un grupo $Mn_4CaO_5$ cuya estructura se ha determinado a una resolución de 1.9 Å mediante cristalografía de rayos X. Tres átomos de Mn (núms. 1-3), un átomo de Ca y cuatro átomos de O (núms. 1, 2, 3, 5) están dispuestos como parte de un grupo asimétrico similar a un cubo con un puente hacia el cuarto átomo de Mn y el quinto átomo de O en los sitios cercanos. Dos moléculas de agua están unidas al Ca y dos más están ligadas a $Mn_4$. Es probable que la reacción entre los átomos de oxígeno de dos de estas moléculas de agua unidas conduzca a la formación de un enlace O═O.

FUENTE: *b*) Tomada de Yasufumi Umena, *et al. Nature* 473:57,2011; cortesía de Nobuo Kamiya. © 2011, reproducida con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

de una milmillonésima de segundo y es el primer paso esencial en la fotosíntesis.

Debido a que están cargados de manera opuesta, $P680^+$ y $Feo^-$ exhiben una obvia reactividad entre sí. La interacción entre las especies con carga opuesta se previene alejando las cargas separadas, moviéndolas en última instancia a los lados opuestos de la membrana, mediante el paso a través de varios sitios diferentes.

La $Feo^-$ transfiere su electrón (paso 2, figura 6-11*a*) a una molécula de plastoquinona (denominada $PQ_A$ en la figura 6.11*a*) unida cerca del lado externo (lado del estroma) de la membrana. La plastoquinona (PQ, *plastoquinone*) es una molécula soluble en lípidos (**FIGURA 6-12**) de estructura similar a la ubiquinona (véase figura 5-12*c*). El electrón se transfiere desde $PQ_A$ (paso 3, figura 6-11*a*) a una segunda plastoquinona (designada $PQ_B$ en la figura 6-11) para producir una forma semirreducida de la molécula ($PQ_B^{\cdot-}$) que permanece firmemente unida a la proteína D1 del centro de reacción. Con cada una de estas transferencias, el electrón se mueve más cerca del lado del estroma de la membrana.

El pigmento cargado positivamente ($P680^+$) se reduce de nuevo a P680 (como se describe a continuación), que prioriza el centro de reacción para la absorción de otro fotón, que envía un segundo electrón energizado a lo largo del trayecto de P680 a feofitina a $PQ_A$ a ($PQ_B^{\cdot-}$), formando ($PQ_B^{2-}$) (paso 4, figura 6-11), que se combina con dos protones para formar plastoquinol, $PQH_2$ [paso 5, figura 6-11*a*), figura 6-12]. Los protones utilizados en la formación de $PQH_2$ se derivan del estroma, causando una disminución en la concentración de $H^+$ del estroma, lo que contribuye a la formación del gradiente de protones. La molécula de $PQH_2$ reducida se disocia de la proteína D1 y se difunde en la bicapa lipídica. El $PQH_2$ desplazado se reemplaza por una molécula de PQ totalmente oxidada derivada de una pequeña "reserva" de moléculas de plastoquinona en la bicapa (paso 6, figura 6-11*a*). Podemos resumir esta parte de la reacción de PSII con la ecuación

$$2\,e^- + PQ + 2\,H^+_{estroma} \xrightarrow{\text{2 fotones}} PQH_2$$

Como veremos en breve, la oxidación de una molécula de agua por el PSII requiere cuatro fotones, por lo que podemos describir mejor esta parte de la reacción de PSII con la ecuación

$$4\,e^- + 2\,PQ + 4\,H^+_{estroma} \xrightarrow{\text{4 fotones}} 2\,PQH_2$$

Seguiremos el destino de los electrones (y protones) transportados por $PQH_2$ en la siguiente sección.

**EL FLUJO DE ELECTRONES DESDE EL AGUA HASTA EL PSII** Todos estos electrones provienen del agua

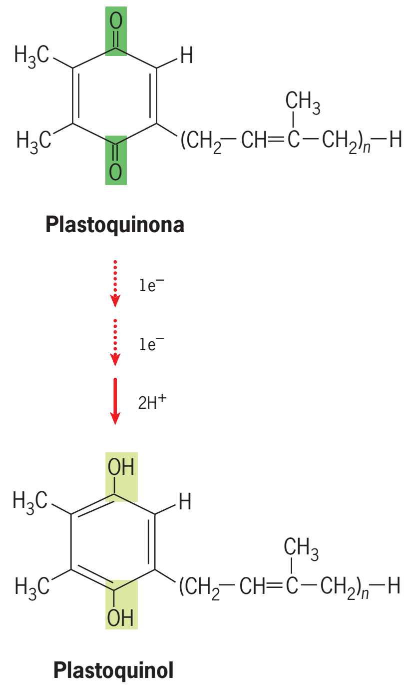


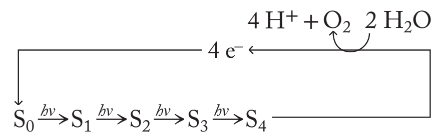

**FIGURA 6-12 Plastoquinona.** La aceptación de dos electrones y dos protones reduce la PQ (plastoquinona) a $PQH_2$ (plastoquinol). Los productos intermedios son similares a los que se muestran en la figura 5-12c) para la ubiquinona de la mitocondria.

y se liberan cuando el agua se divide en protones y oxígeno molecular. Pero el agua es una molécula muy estable, compuesta por átomos de hidrógeno y oxígeno fuertemente retenidos. De hecho, la división del agua es la reacción más desafiante termodinámicamente (endotérmica) que se sabe ocurre en los organismos vivos. La división del agua en un laboratorio requiere el uso de una fuerte corriente eléctrica, o de temperaturas cercanas a 2 000 °C. Sin embargo, una célula vegetal puede lograr esta hazaña en una ladera nevada utilizando solo la energía de la luz visible.

Vimos en la sección anterior cómo la absorción de luz por el PSII conduce a la formación de dos moléculas cargadas, $P680^+$ y $Feo^-$. Hemos seguido la ruta tomada por el electrón excitado asociado con $Feo^-$; ahora nos dirigimos a la otra especie, $P680^+$, que es el agente oxidante más poderoso aún por ser descubierto en un sistema biológico. El potencial redox de la forma oxidada de $P680^+$ es lo suficientemente fuerte como para extraer los electrones fuertemente retenidos (de baja energía) del agua (potencial redox de +0.82 V), dividiendo así la molécula. La división del agua durante la fotosíntesis se llama **fotólisis**. Se cree que la formación de una molécula de oxígeno durante la fotólisis requiere la pérdida *simultánea* de cuatro electrones de dos moléculas de agua según la reacción

$$2\,H_2O \xrightarrow{\text{4 fotones}} 4\,H^+_{\text{lumen}} + O_2 + 4\,e^-$$

Sin embargo, un centro de reacción PSII solo puede generar una carga positiva ($P680^+$) o una oxidación equivalente al mismo tiempo. Una solución a este problema fue propuesta alrededor de 1970 por Pierre Joliot y Bessel Kok como la hipótesis del estado S, que permite al fotosistema acumular los cuatro equivalentes oxidantes necesarios para oxidar el agua. Estrechamente asociado con la proteína D1 del PSII en su superficie luminal hay un grupo de cinco átomos de metal —cuatro átomos de manganeso (Mn) y un átomo de calcio (Ca)— que es estabilizado y protegido mediante varias proteínas periféricas que forman el *complejo tranformador de oxígeno* (figura 6-11*a*). La organización geométrica del grupo Mn-Ca se muestra en la figura 6-11*b* y se analiza en la leyenda que lo acompaña. El grupo Mn-Ca acumula cuatro equivalentes oxidantes mediante la transferencia de cuatro electrones, uno a la vez, al $P680^+$ cercano. La transferencia de cada electrón desde el grupo Mn-Ca a $P680^+$ (pasos B y A de la figura 6-11) se realiza mediante el paso a través de un transportador intermedio de electrones, un residuo de tirosina en la proteína $D_1$, denominado Tyrz. Después de que cada electrón se transfiere a $P680^+$, regenerando P680, el pigmento se vuelve a oxidar (y regresa a $P680^+$) después de la absorción de otro fotón por el fotosistema. Por tanto, la acumulación progresiva de cuatro equivalentes oxidantes por el grupo Mn-Ca es impulsada por la absorción sucesiva de cuatro fotones de luz por el sistema fotosensible PSII. Una vez que esto ha ocurrido, el sistema puede entonces catalizar la eliminación de $4e^-$ de dos moléculas de $H_2O$ estrechamente unidas (figura 6-11 *b*), como se indica de la siguiente manera:




donde el subíndice en la S indica la cantidad de equivalentes oxidantes almacenados por el grupo Mn-Ca. La evidencia de la acumulación de equivalentes oxidantes sucesivos se obtuvo primero por exposición de células de algas a destellos de luz muy breves (1 μs) (**FIGURA 6-13**). Se puede observar en este gráfico que la producción de $O_2$ alcanza su punto máximo después de cada cuarto destello de luz, lo que indica que debe acumularse el efecto de cuatro fotorreacciones individuales antes de que se pueda liberar $O_2$.

Los protones producidos en la reacción de fotólisis se retienen en el lumen tilacoide (figura 6-11), donde contribuyen al gradiente de protones. Los cuatro electrones producidos en la reacción de fotólisis sirven para regenerar el grupo Mn-Ca completamente reducido (estado $S_0$), mientras que el $O_2$ se libera como un producto de desecho hacia el medio ambiente.

Antes de abandonar el tema del PSII, puede observarse que la actividad e integridad de este fotosistema puede verse afectada negativamente por la alta intensidad de la luz. Este fenómeno se denomina *fotoinhibición*. La formación de un agente oxidante muy fuerte, y el peligro siempre presente de formar especies de oxígeno altamente tóxicas, le dan al PSII el potencial de su propia

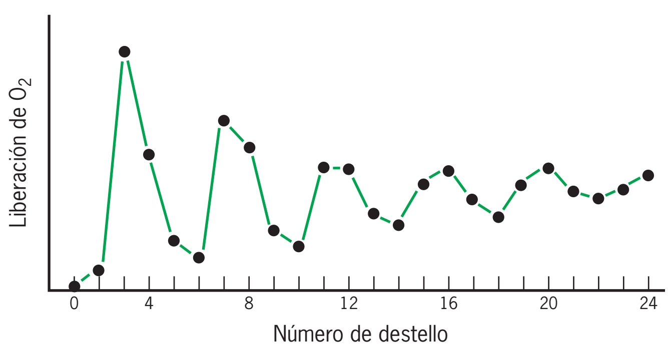



**FIGURA 6-13 Medición de la cinética de liberación de $O_2$.** El gráfico muestra la respuesta de cloroplastos aislados que se han mantenido en la oscuridad, a una sucesión de destellos de luz de muy corta duración. La cantidad de oxígeno liberada alcanza su punto máximo con cada cuarto destello. El primer pico ocurre después de tres destellos (en lugar de cuatro) porque la mayor parte del grupo de manganeso está presente en el estado $S_1$ (un equivalente oxidante) cuando se mantiene en la oscuridad. Las oscilaciones se amortiguan a medida que aumenta el número de destellos.

autodestrucción como resultado de la sobreexcitación del sistema. La mayor parte del daño parece estar dirigido al polipéptido (D1) que se une a los centros redox activos y al grupo Mn-Ca del fotosistema. Los cloroplastos contienen un mecanismo para la degradación proteolítica selectiva de D1 y su reemplazo por una molécula polipeptídica recién sintetizada.

**DE PSII A PSI** Se describió anteriormente cómo la absorción sucesiva de dos fotones por el centro de reacción del PSII conduce a la formación de una molécula de $PQH_2$ completamente reducida. En consecuencia, la producción de una sola molécula de $O_2$, que requiere la absorción de cuatro fotones por el PSII, conduce a la formación de dos moléculas de $PQH_2$. La $PQH_2$ es un transportador de electrones móvil que se difunde a través de la bicapa lipídica de la membrana tilacoide y se une a un gran complejo multiproteico llamado *citocromo* $b_6f$ (figura 6-14). Cada molécula de $PQH_2$ dona sus dos electrones al *citocromo* $b_6f$, mientras que sus dos protones se liberan en el lumen. El citocromo $b_6f$ está relacionado en estructura y función con el citocromo $bc_1$ de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias (página 185). Ambos complejos tienen quinolitos como sustratos y comparten grupos redox similares, ambos pueden ser envenenados por algunos de los mismos inhibidores, y ambos participan en un ciclo Q que transloca 4 $H^+$ por cada par de electrones similar al complejo III de la mitocondria (véase figura 5-17). En este caso, dos $H^+$ son donados por $PQH_2$, y dos $H^+$ adicionales se translocan a través del complejo desde el estroma. Debido a que todos estos protones se habían derivado originalmente del estroma, su liberación en el lumen constituye un movimiento de protones a través de la membrana tilacoide (véase figura 6-16*b*). Los electrones del citocromo $b_6f$ se pasan a otro portador de electrones móvil, una proteína de membrana periférica que contiene cobre soluble en agua llamada *plastocianina*, situada en el lado luminal de la membrana tilacoide (**FIGURA 6-14**). La plastocianina transporta los electrones al lado luminal del PSI, donde se transfieren a $P700^+$, el pigmento cargado positivamente del centro de reacción del PSI, completando así el vínculo entre el PSII y el PSI.

Tenga en cuenta que todas las transferencias de electrones descritas en esta exposición son exotérmicas y ocurren cuando los electrones pasan a los portadores con una afinidad creciente por los electrones (potenciales redox más positivos, página 179). La necesidad de portadores de electrones móviles, como $PQH_2$ y plastocianina, se hizo evidente cuando se descubrió que los dos tipos de fotosistemas (PSII y PSI) no están situados muy cerca el uno del otro en la membrana, sino que están separados por distancias en el orden de los 0.1 µm.

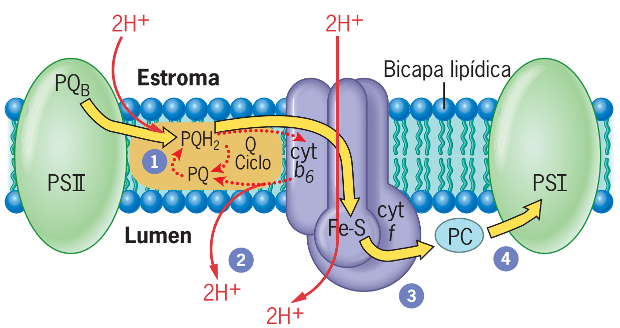



**FIGURA 6-14 Transporte de electrones entre PSII y PSI.** El flujo de un par de electrones está indicado por la flecha amarilla. El citocromo $b_6f$ funciona de una manera muy similar a la del citocromo $bc_1$ en la mitocondria y se involucra en un ciclo Q (no analizado en el texto) que transloca cuatro protones por cada par de electrones que se mueve a través del complejo. La $PQH_2$ y la PC (plastocianina) son vehículos móviles que pueden transportar electrones entre fotosistemas distantes.

## Operaciones del PSI: la producción de NADPH

El PSI de las plantas superiores consiste en un núcleo de centro de reacción formado por 12-14 subunidades polipeptídicas y un complejo periférico de pigmentos unidos a proteínas llamado LHCI. La energía de la luz es absorbida por los pigmentos de la antena de LHCI y pasa al pigmento P700 del centro de reacción PSI, que es un dímero de clorofila *a* (**FIGURA 6-15**). Después de la absorción de energía, un pigmento del centro de reacción excitado (P700*) transfiere un electrón a una molécula separada de clorofila *a* monomérica (designada $A_0$), que actúa como el principal aceptor de electrones (paso 1, figura 6-14). Como en PSII, la absorción de luz conduce a la producción de dos especies cargadas, en este caso $P700^-$ y $A_0^-$. $A_0^-$ es un agente reductor muy fuerte, con un potencial redox de aproximadamente 1.0 V, que está muy por encima del necesario para reducir $NADP^+$ (potencial redox de –0.32 V). La carga positiva del pigmento $P700^+$ se neutraliza por un electrón entrante donado por la plastocianina, como se indicó anteriormente.

La separación inicial de carga en el PSI se estabiliza mediante el paso del electrón desde $A_0^-$ a través de varios cofactores que comienzan con un tipo de quinona llamada *filoquinona* (designada $A_1$) y luego tres grupos de hierro-azufre (denominados $F_X$, $F_B$ y $F_A$) (pasos 2-4, figura 6-15). La oxidación de P700 a $P700^+$ ocurre

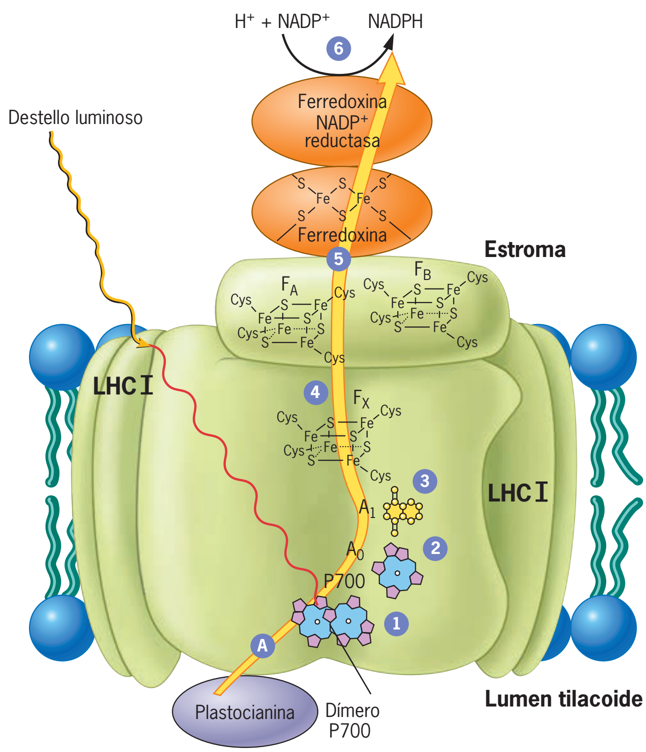



**FIGURA 6-15 Organización funcional del fotosistema I.** El camino tomado por los electrones está indicado por la flecha amarilla. Los eventos comienzan con la absorción de luz por un pigmento de antena y la transferencia de energía a una clorofila P700 en el centro de reacción del PSI. La absorción de energía por P700 causa la excitación de un electrón y su transferencia (paso 1) a $A_0$, que es el principal aceptor de electrones del PSI. El electrón pasa posteriormente a $A_1$ (paso 2) y luego a un centro de hierro-azufre llamado $F_X$ (paso 3). A partir de $F_X$ el electrón se transfiere (paso 4) a través de dos centros más de hierro-azufre ($F_A$ y $F_B$), que están unidos por una proteína periférica en el lado del estroma de la membrana. El electrón finalmente se transfiere a ferredoxina, una pequeña proteína de hierro-azufre (paso 5) que es externa al complejo del PSI. Cuando dos moléculas diferentes de ferredoxina han aceptado un electrón, actúan juntas para reducir una molécula de $NADP^+$ a NADPH (paso 6). El pigmento del centro de reacción deficiente en electrones ($P700^+$) se reduce mediante un electrón donado por la plastocianina (paso A).

en el lado luminal de la membrana. Como se indica en la figura 6-15, el electrón que se pierde en el aceptor primario pasa a través del PSI a los centros de hierro-sulfuro unidos al lado del estroma de la membrana. Posteriormente, el electrón se transfiere de PSI a una pequeña proteína de hierro-azufre, soluble en agua, llamada *ferredoxina* (paso 5, figura 6-15) asociada con la superficie del estroma de la membrana. La reducción de $NADP^+$ para formar NADPH (paso 6, figura 6-15) está catalizada por una enzima grande llamada ferredoxina-$NADP^+$ reductasa, que contiene un grupo FAD no proteínico capaz de aceptar y transferir dos electrones (página 180). Una molécula de ferredoxina individual puede donar solo un electrón, de modo que en la reducción actúan juntas dos ferredoxinas:

$$2\ \text{Ferredoxina}_{\text{red}} + H^+ + NADP^+ \xrightarrow{\text{Ferredoxina}-\text{NADP}^+\ \text{Reductasa}} 2\ \text{Ferredoxina}_{\text{ox}} + \text{NADPH}$$

La eliminación de un protón del estroma también se agrega al gradiente de protones a través de la membrana tilacoide. Podemos escribir la reacción global para el PSI, basada en la absorción de cuatro fotones como se hizo para PSII, del siguiente modo:

$$4\ e^- + 2\ H^+_{\text{estroma}} + 2\ NADP^+ \xrightarrow{\text{4 fotones}} 2\ \text{NADPH}$$

No todos los electrones pasados a ferredoxina terminan inevitablemente en NADPH; pueden tomarse rutas alternativas dependiendo del organismo y las condiciones particulares. Por ejemplo, los electrones del PSI se pueden usar para reducir varios aceptores inorgánicos. Estos caminos para los electrones pueden conducir a la reducción eventual de nitrato ($NO_3^-$) a amoniaco ($NH_3$), o de sulfato ($SO_4^{2-}$) a sulfihidrilo (—SH), que son ingredientes clave de las moléculas biológicas. Por tanto, la energía de la luz solar se usa no solo para reducir los átomos de carbono más oxidados (aquellos contenidos en $CO_2$), sino también para reducir las formas altamente oxidadas de los átomos de nitrógeno y azufre.

**REPASO**

1. Describa la secuencia de eventos que sigue a la absorción de un fotón de luz por el pigmento del centro de reacción del fotosistema II. Describa los eventos comparables en el fotosistema I. ¿Cómo se relacionan los dos fotosistemas?
2. Describa la diferencia en los potenciales redox de los pigmentos del centro de reacción de los dos fotosistemas.
3. Describa el proceso por el cual el agua se divide durante la fotólisis. ¿Cuántos fotones deben ser absorbidos por el PSII para que esto ocurra?

## 6.7 Una descripción general del transporte fotosintético de electrones

La **FIGURA 6-16*a*)** muestra la estructura molecular de los principales componentes implicados en las reacciones dependientes de la luz de la membrana tilacoide. El conocimiento de estas estructuras ha demostrado ser invaluable para desbloquear muchos de los misterios de la fotosíntesis a nivel molecular. Si miramos hacia atrás sobre todo el proceso de transporte de electrones que tiene lugar durante la fotosíntesis oxigénica (resumida en la figura 6-16*b*), podemos ver que los electrones viajan del agua al $NADP^+$ por la acción de dos fotosistemas absorbentes de luz. Los eventos que ocurren en el PSII generan un fuerte agente oxidante capaz de producir $O_2$ a partir del agua, mientras que los eventos en el PSI generan un agente reductor fuerte capaz de producir NADPH a partir de $NADP^+$. Estos dos eventos se encuentran en los extremos opuestos de la química redox en los organismos vivos. Como se señaló en la página 209, la producción de una molécula de $O_2$ requiere la eliminación de cuatro electrones de dos moléculas de agua. La eliminación de cuatro electrones del agua requiere la absorción de cuatro fotones, uno para cada electrón. Al mismo tiempo, la reducción de una molécula de $NADP^+$ requiere la transferencia de dos electrones. Por tanto, hipotéticamente, si solo un fotosistema fuera capaz de transferir electrones de $H_2O$ a $NADP^+$, cuatro fotones serían suficientes para producir dos moléculas de NADPH. Debido a que se utilizan dos fotosistemas en la célula, ese número se duplica a ocho fotones, cuatro se utilizan en el PSII y cuatro en el PSI. En otras palabras, la célula debe absorber un total de ocho moles de fotones para generar un mol de oxígeno molecular y dos moles de NADPH. Por tanto, si agregamos las reacciones de PSII y PSI, *ignorando los protones por un momento*, llegamos a una ecuación general para las reacciones de luz de

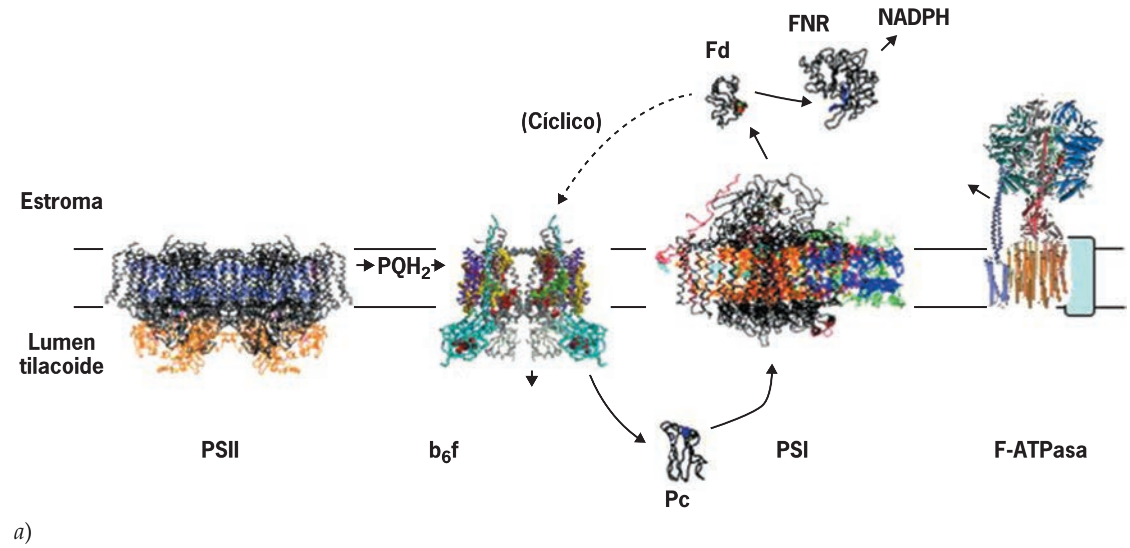
$$2\ H_2O + 2\ NADP^+ \xrightarrow{\text{8 fotones}} 1\ O_2 + 2\ \text{NADPH} \quad (\text{reacción de luz general})$$

Además, las reacciones de luz de la fotosíntesis establecen un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide que conduce a la formación de ATP. El gradiente de protones se forma como resultado de la eliminación de $H^+$ del estroma y la adición $H^+$ al lumen tilacoide. Las contribuciones al gradiente de protones (véase figura 6-16*b*) surgen de 1) la división del agua en el lumen; 2) la oxidación del plastoquinol ($PQH_2$) por el citocromo $b_6f$, liberando protones en el lumen, y 3) las reducciones de $NADP^+$ y PQ, que eliminan protones del estroma.

Las reacciones leves de la fotosíntesis emplean una cantidad considerable de portadores de electrones que sirven como objetivos para una variedad de diferentes productos químicos destinados a eliminar plantas (herbicidas). Una serie de herbicidas comunes, que incluyen diuron, atrazina y terbutrina, actúan uniéndose a una proteína central del PSII. Vimos en la página 208 cómo la absorción de luz por el PSII conduce a la producción de una molécula de $PQH_2$ que posteriormente se libera del sitio $Q_B$ del PSII y se reemplaza por una PQ de la reserva. Los herbicidas enumerados anteriormente actúan uniéndose al sitio $Q_B$ abierto después de la liberación de $PQH_2$, bloqueando el transporte de electrones a través del PSII. El herbicida paraquat ha recibido atención en los medios de comunicación porque se usa para matar plantas de marihuana y porque sus residuos son altamente tóxicos para los humanos. El paraquat interfiere con la función del PSI compitiendo con la ferredoxina por electrones del centro de reacción del PSI. Los electrones que se desvían al paraquat se transfieren posteriormente al $O_2$, generando radicales de oxígeno muy reactivos (página 34) que dañan los cloroplastos y matan a la planta. El paraquat destruye el tejido humano al generar radicales de oxígeno usando electrones desviados del complejo I de la cadena respiratoria (página 184).

**REPASO**

1. ¿Qué pasos en las reacciones dependientes de la luz son responsables de generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana tilacoide?



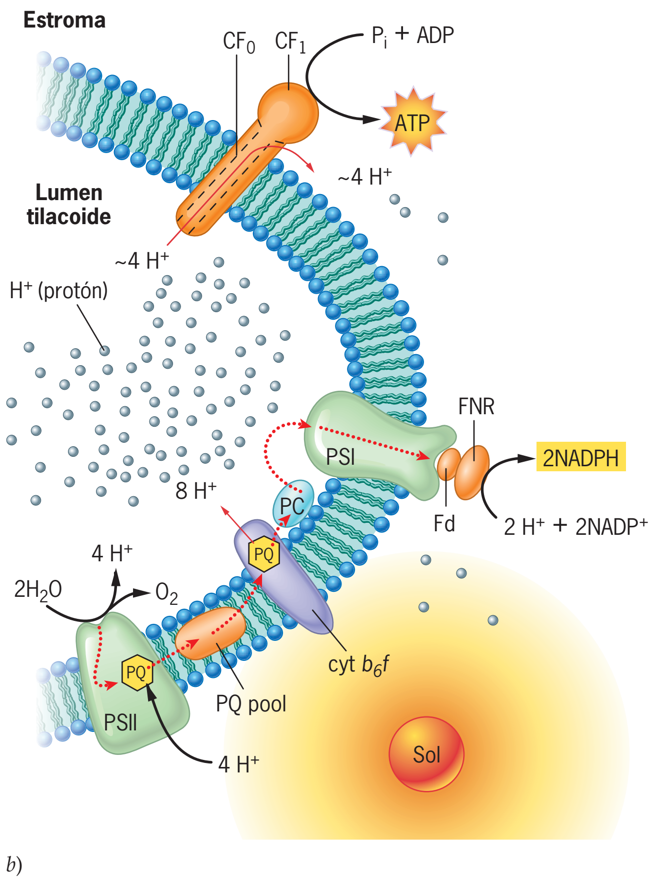




**FIGURA 6-16 Resumen de las reacciones dependientes de la luz.** *a*) Estructuras tridimensionales de las proteínas de la membrana tilacoide que llevan a cabo las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis. De los cuatro complejos principales de proteínas, el PSII y el citocromo $b_6f$ están presentes en la membrana como dímeros, mientras que el PSI y la ATP sintasa (que se muestran en mayor detalle en la figura 5-24) están presentes como monómeros. *b*) Resumen del flujo de electrones desde $H_2O$ hasta NADPH a través de los tres complejos transmembrana. Esta figura muestra el número estimado de protones translocados a través de la membrana como resultado de la oxidación de dos moléculas de agua, produciendo dos pares de electrones. También se muestra la ATP sintasa de las membranas tilacoides (véase sección 5.7 para el análisis de la enzima sintetizadora de ATP). Se requieren aproximadamente cuatro protones para la síntesis de cada molécula de ATP (página 193).

FUENTE: *a*) Tomado de Nature Revs. Mol. Cell Biol 5:973,2004, fig. 1B., imagen proporcionada por cortesía de Nathan Nelson. © 2004, Macmillan Publishers Ltd.

## 6.8 Fotofosforilación

Las reacciones dependientes de la luz analizadas en secciones previas proporcionan la energía requerida para reducir el $CO_2$ a carbohidratos. La conversión de un mol de $CO_2$ en un mol de carbohidrato ($CH_2O$, *carbohydrate*) requiere la entrada de tres moles de ATP y dos moles de NADPH (véase figura 6-19). Ya hemos visto cómo las células vegetales producen el NADPH requerido para la fabricación de carbohidratos; veamos ahora cómo estas mismas células producen el ATP necesario.

La maquinaria para la síntesis de ATP en un cloroplasto es prácticamente idéntica a la de una mitocondria o una membrana plasmática de una bacteria aeróbica. Como en esos casos, la ATP sintasa (figura 6-16) consiste en una cabeza (llamada $CF_1$ en los cloroplastos), que contiene el sitio catalítico de la enzima, y una base ($CF_o$), que abarca la membrana y media el movimiento del protón. Las dos partes están conectadas por un tallo giratorio. Las cabezas de $CF_1$ se proyectan hacia afuera en el estroma de acuerdo con la orientación del gradiente de protones, que tiene su mayor concentración dentro del lumen tilacoide (figura 6-16). Por tanto, los protones se mueven desde una mayor concentración en el lumen a través de la base $CF_o$ de la ATP sintasa y hacia el estroma, impulsando la fosforilación de ADP, como se describe en el capítulo 5 para las mitocondrias.

Las mediciones realizadas durante los periodos de máxima síntesis de ATP sugieren que existen diferencias en las concentraciones de $H^+$ de 1 000 a 2 000 pliegues a través de las membranas de los tilacoides, lo que corresponde a un gradiente de pH (ΔpH) de más de tres unidades. El movimiento de los protones en el lumen durante el transporte de electrones se neutraliza por el movimiento de otros iones, por lo que no se acumula un potencial de membrana significativo. Por tanto, a diferencia de las mitocondrias donde la fuerza generada por el protón se expresa principalmente como un potencial electroquímico (página 187), la fuerza generada por el protón (Δp) que actúa en los cloroplastos es en gran medida, si no exclusivamente, debida a un gradiente de pH.

La formación de ATP durante el proceso de fotosíntesis oxigénica se denomina **fotofosforilación no cíclica** porque los electrones se mueven en una trayectoria lineal (es decir, no cíclica) desde el $H_2O$ hasta $NADP^+$ (figura 6-16). Durante la década de 1950 Daniel Arnon, de la Universidad de California, Berkeley, descubrió que los cloroplastos aislados no solo podían sintetizar ATP a partir de ADP, sino que podían hacerlo incluso en ausencia o adición de $CO_2$ o $NADP^+$. Estos experimentos indicaron que los cloroplastos tenían un medio para la formación de ATP que no requería la mayoría de las reacciones fotosintéticas que habrían llevado a la producción de oxígeno, la fijación de $CO_2$ o la reducción de $NADP^+$. Todo cuanto hacía falta era iluminación, cloroplastos, ADP y Pi. El proceso que Arnon descubrió se llamó luego **fotofosforilación cíclica**, y es un proceso que se lleva a cabo mediante el PSI con independencia del PSII. A pesar de que se descubrió hace más de 50 años, la fotofosforilación cíclica no se comprende bien. Estudios recientes sugieren que hay dos vías superpuestas para el transporte cíclico de electrones, una de las cuales se describe en la **FIGURA 6-17**. El transporte cíclico de electrones comienza con la absorción de un cuanto de luz por el PSI y la transferencia de un electrón de alta energía al aceptor primario. En la ruta representada en la figura 6-17, el electrón pasa a la ferredoxina, como es siempre el caso, pero en lugar de transferirse al $NADP^+$, el electrón se dirige al centro de reacción deficiente de electrones (como se muestra en la figura 6-17) para completar el ciclo. Durante el flujo de un electrón alrededor de este curso, se libera suficiente energía para translocar protones (estimados en dos $H^+/e^-$) a través de la membrana por el complejo del citocromo $b_6f$ y construir un gradiente de protones capaz de conducir la síntesis de ATP. Se piensa que la fotofosforilación cíclica proporciona el ATP adicional requerida para la síntesis de carbohidratos (véase figura 6-19) y también para otras actividades que requieren ATP en el cloroplasto (p. ej., implicación del chaperón molecular en la importación de proteínas). La inhibición de la fotofosforilación cíclica conduce a un deterioro en el desarrollo y el crecimiento de las plantas superiores.

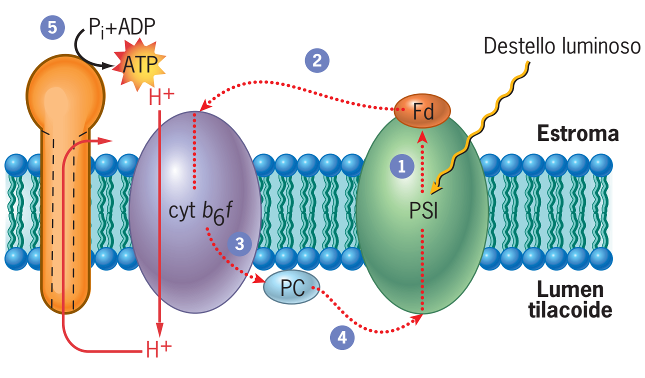



**FIGURA 6-17 Esquema simplificado de la fotofosforilación cíclica.** La absorción de la luz por el PSI excita un electrón que se transfiere a la ferredoxina (paso 1) y al citocromo $b_6f$ (paso 2), a la plastocianina (paso 3) y regresa a $P700^+$ (paso 4). En el proceso, los protones son translocados por el citocromo $b_6f$ para formar un gradiente utilizado para la síntesis de ATP (paso 5). No se muestra otra ruta cíclica para el transporte de electrones que implique el movimiento de electrones de PSI a través de NADPH al citocromo $b_6f$.

Ahora que hemos visto cómo las reacciones de luz de la fotosíntesis conducen a la producción de ATP y NADPH, que son los depósitos de energía necesarios para la síntesis de carbohidratos, podemos avanzar hacia las reacciones que conducen a la formación de carbohidratos.

**REPASO**

1. ¿En qué medida el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana tilacoide se refleja en un gradiente de pH *vs.* un voltaje?
2. ¿Cómo el gradiente de protones conduce a la formación de ATP?

## 6.9 Síntesis de carbohidratos en plantas $C_3$

Después de la Segunda Guerra Mundial, Melvin Calvin, de la Universidad de California, Berkeley, junto con sus colegas Andrew Benson y James Bassham, comenzaron lo que iba a ser un estudio de décadas sobre las reacciones enzimáticas por las cuales el dióxido de carbono se asimilaba en las moléculas orgánicas de la célula. Armados con el recién disponible isótopo radiactivo de larga duración de carbono ($^{14}C$), y con una nueva técnica —la cromatografía bidimensional en papel—, comenzaron la tarea de identificar todas las moléculas marcadas producidas cuando las células tomaron $[^{14}C]O_2$. Los estudios comenzaron con hojas de plantas, pero pronto cambiaron a un sistema más simple, el alga verde *Chlorella*. Se cultivaron algas en cámaras cerradas en presencia de $CO_2$ no marcado, después de lo cual se introdujo $CO_2$ radiactivo en el medio de cultivo mediante inyección. Después del periodo deseado de incubación con el $CO_2$ marcado, la suspensión de algas se drenó en un recipiente con alcohol caliente, que tuvo los efectos combinados de matar las células inmediatamente, detener la actividad enzimática y extraer moléculas solubles. Los extractos de las células se colocaron entonces como una mancha en papel cromatográfico y se sometieron a cromatografía bidimensional. Para localizar los compuestos radiactivos al final del procedimiento, se presionó una porción de película de rayos X contra el cromatograma, y las placas se mantuvieron en la oscuridad para exponer la película. Después del proceso fotográfico, la identificación de compuestos radiomarcados en el autorradiograma se realizó por comparación con patrones conocidos y mediante análisis químico de las manchas originales. Analicemos algunos de sus hallazgos.

El $CO_2$ marcado se convirtió a compuestos orgánicos reducidos muy rápidamente. Si el periodo de incubación fue muy corto (hasta unos pocos segundos), predominó una mancha radiactiva en el cromatograma (cromatografía) (**FIGURA 6-18**). Se determinó que el compuesto que formaba la mancha era 3-fosfoglicerato (PGA, *3-phosphoglycerate*), uno de los productos intermedios de la glucólisis. El grupo de Calvin sospechó inicialmente que el $CO_2$ se estaba uniendo de forma covalente (o *fijada*) a un compuesto de dos carbonos para formar la molécula de PGA de tres carbonos. Debido a que el primer intermedio que se identificó era una molécula de tres carbonos, las plantas que utilizan esta vía para fijar el $CO_2$ atmosférico se denominan **plantas $C_3$**.

Después de una investigación considerable, se hizo evidente que el aceptor inicial no era un compuesto de dos carbonos, sino un compuesto de cinco átomos de carbono, la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP, *ribulose 1,5-bisphosphate*), que se condensaba con $CO_2$ para producir una molécula de seis átomos de carbono. Este com-

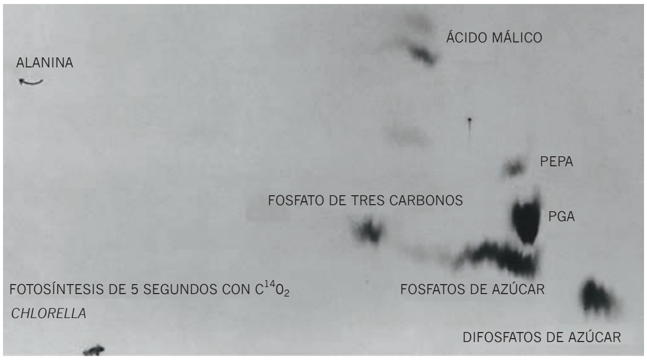



**FIGURA 6-18 De los archivos: cromatograma que muestra los resultados de un experimento en el que las células de algas se incubaron durante 5 segundos en [$^{14}$C]$O_2$ antes de la inmersión en alcohol.** Una mancha, que corresponde a 3-fosfoglicerato (PGA marcado), contiene la mayor parte de la radiactividad.

FUENTE: Cortesía de James Bassham y Melvin Calvin.

puesto de seis carbonos se fragmentó rápidamente en dos moléculas de PGA, una de las cuales contenía el átomo de carbono recientemente agregado. Tanto la condensación de RuBP como la división del producto de seis carbonos (**FIGURA 6-19*a***) se llevan a cabo en el estroma mediante una enzima multisubunidad grande, la *ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa*, que se conoce familiarmente como *Rubisco*. Como enzima responsable de convertir el carbono inorgánico en moléculas biológicas útiles, el Rubisco es una de las proteínas clave en la biosfera. Pero sucede que el Rubisco solo es capaz de fijar alrededor de tres moléculas de $CO_2$ por segundo, lo que puede ser el peor número de renovación de cualquier enzima conocida (véase tabla 3-3). Para compensar esta ineficiencia, una cantidad que asciende a la mitad de las proteínas de las hojas está presente como Rubisco. De hecho, el Rubisco constituye la proteína más abundante en la Tierra, lo que representa de 5 a 10 kg por cada humano.

A medida que se determinó la estructura de los diversos intermedios, junto con las posiciones de los átomos de carbono marcados, se hizo evidente que la ruta para la conversión de $CO_2$ en carbohidratos era cíclica y compleja. Esta vía se ha conocido como el **ciclo de Calvin** (o **ciclo de Calvin-Benson**) y ocurre en las cianobacterias y en todas las células fotosintéticas eucarióticas. Una versión simplificada del ciclo de Calvin se muestra en la figu-

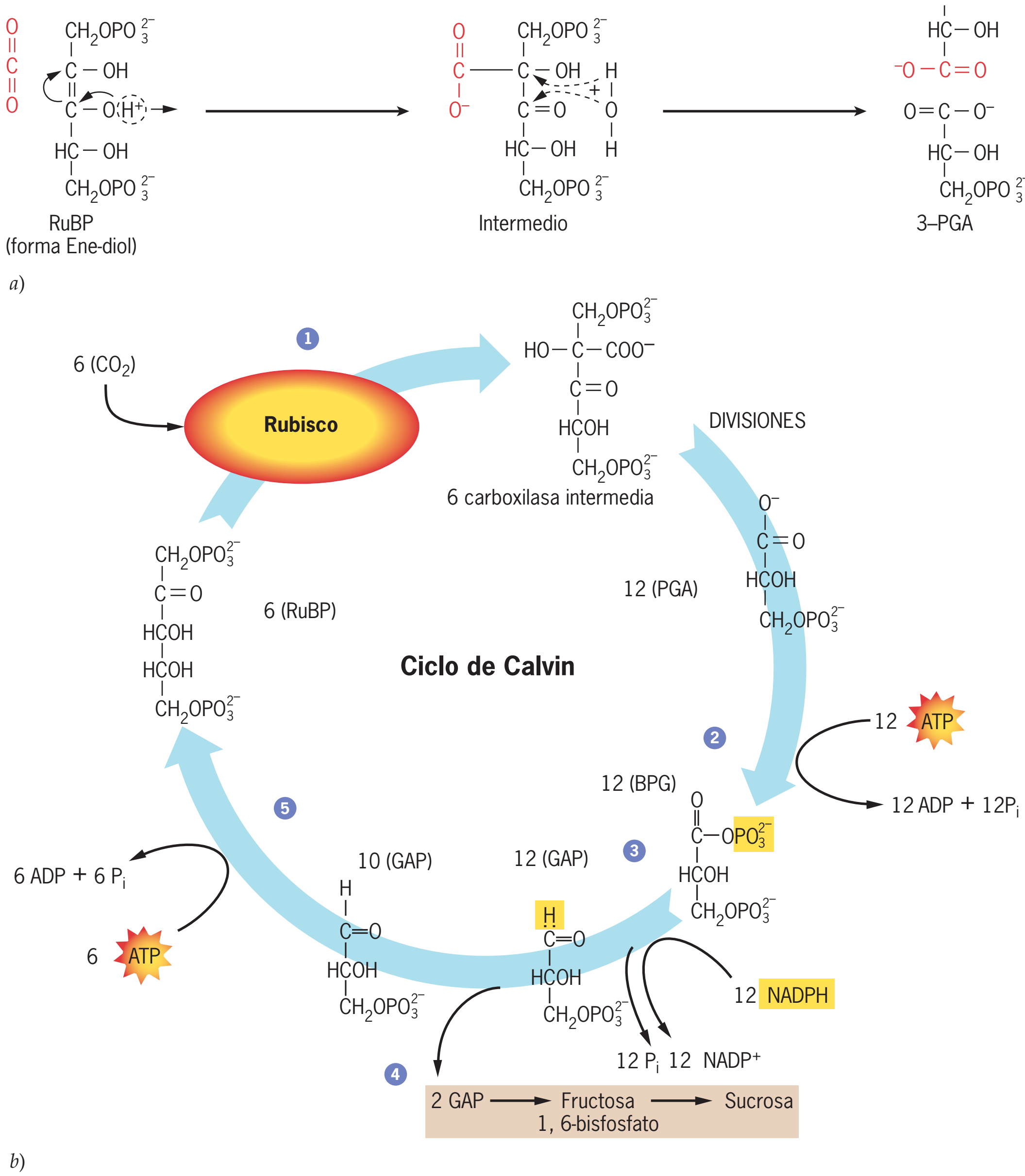



**FIGURA 6-19 Convirtiendo $CO_2$ en carbohidratos.** *a*) La reacción catalizada por ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), en la que el $CO_2$ se fija por enlace a RuBP. El producto se divide rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA). *b*) Una versión abreviada del ciclo de Calvin que muestra el destino de seis moléculas de $CO_2$ que se fijan por combinación con seis moléculas de RuBP. (Numerosas reacciones se han eliminado). La fijación de $CO_2$ se indica en el paso 1. En el paso 2, las 12 moléculas de PGA se fosforilan mediante hidrólisis de ATP para formar 12 moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato (BPG, *1,3-bisphosphoglycerate*), que se reducen en el paso 3 por electrones proporcionados por NADPH para formar 12 moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (GAP, *glyceraldehyde 3-phosphate*). Aquí, dos de las BPA se agotan (paso 4) para ser utilizadas en la síntesis de sacarosa en el citosol, que puede considerarse el producto de las reacciones dependientes de la luz. Las otras 10 moléculas se convierten en seis moléculas de RuBP (paso 5), que pueden actuar como el aceptor de seis moléculas más de $CO_2$. La regeneración de seis RuBP requiere la hidrólisis de 6 moléculas de ATP. El NADPH y el ATP utilizados en el ciclo de Calvin representan los dos productos de alta energía resultantes de las reacciones dependientes de la luz.

ra 6-19*b*). El ciclo comprende tres partes principales: 1) carboxilación de RuBP para formar PGA; 2) reducción de PGA al nivel de un azúcar ($CH_2O$) mediante la formación de gliceraldehído 3-fosfato (GAP) usando el NADPH y el ATP producidos en las reacciones dependientes de la luz, y 3) la regeneración de RuBP, que también requiere ATP. Si mira hacia atrás en la figura 3-24, verá que la formación de GAP de PGA en el ciclo de Calvin es el inverso de los pasos 5 a 7 de la vía glucolítica. Esta simple comparación de unas pocas reacciones sirve como otro recordatorio de que la respiración y la fotosíntesis son vías bioquímicas que corren en direcciones opuestas. En esta serie de reacciones, la respiración genera NADH y ATP, mientras que las reacciones inversas de la fotosíntesis gastan NADPH y ATP.

Se puede ver en la figura 6-19*b*) que por cada seis moléculas de $CO_2$ fijadas, se producen 12 moléculas de GAP. (GAP es la mancha marcada con fosfato de tres carbonos en el cromatograma de la figura 6-18). Los átomos en 10 de estas moléculas GAP de tres carbonos se reorganizan para regenerar seis moléculas del aceptor de cinco carbonos $CO_2$, RuBP (figura 6-19*b*). Las otras dos moléculas de GAP se pueden considerar como productos. Estas moléculas GAP pueden exportarse al citosol a cambio de iones fosfato (véase **FIGURA 6-20**) y usarse para sintetizar el disacárido sacarosa. Alternativamente, el GAP puede permanecer en el cloroplasto donde se convierte en almidón. En la figura 6-20 se muestra una visión general de todo el proceso de fotosíntesis, incluidas las reacciones luminosas (absorción de la luz, oxidación del agua, reducción de $NADP^+$, translocación de protones), la fosforilación de ADP, el ciclo de Calvin y la síntesis de almidón o sacarosa.

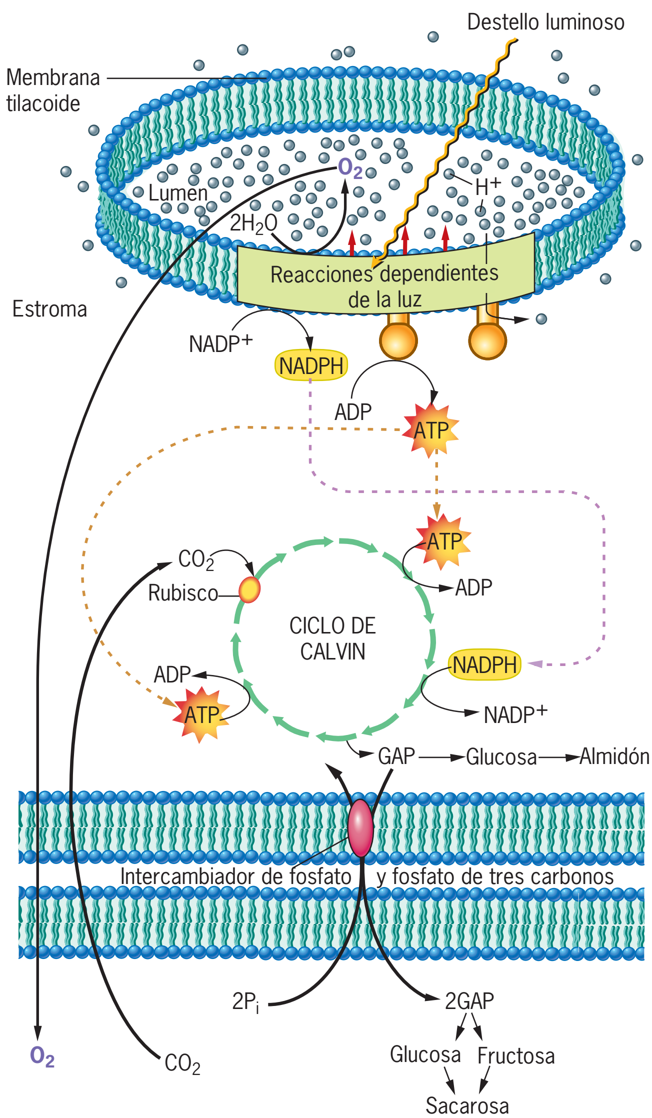



**FIGURA 6-20 Una visión general de las diversas etapas de la fotosíntesis.**

Las moléculas de sacarosa que se forman en el citosol de las GAP del ciclo de Calvin se transportan fuera de las células de la hoja y hacia el floema, desde donde se transportan a los diversos órganos no fotosintéticos de la planta. Del mismo modo que la glucosa sirve como fuente de energía y como componente estructural orgánico en la mayoría de los animales, la sacarosa cumple una función análoga en la mayoría de las plantas. El almidón, por otro lado, se almacena en los cloroplastos como gránulos (véase figura 2-17*b*). Así como el glucógeno almacenado proporciona a los animales glucosa fácilmente disponible en tiempos de necesidad, el almidón almacenado en las hojas de una planta le proporciona azúcares durante la noche, cuando las reacciones luminosas no están posibles. Es evidente a partir de las reacciones de la figura 6-19*b*) que la síntesis de carbohidratos es una actividad costosa. La conversión de seis moléculas de $CO_2$ en una molécula de azúcar de seis carbonos y la regeneración de RuBP requiere 12 moléculas de NADPH y 18 moléculas de ATP. Este gran gasto de energía refleja el hecho de que el $CO_2$ es la forma más altamente oxidada en la que el carbono puede manifestarse.

## Control redox

A lo largo de este libro analizaremos una amplia gama de mecanismos utilizados por las células para controlar la actividad de las proteínas. Uno de estos mecanismos, conocido como *control redox*, aparece cada vez más como un regulador de los procesos celulares básicos, incluido el plegamiento, la transcripción y la traducción de proteínas. Lo explicaremos aquí porque se entiende mejor como regulador del metabolismo de los cloroplastos. Varias enzimas clave del ciclo de Calvin solo son activas a la luz cuando se produce ATP y NADPH por fotosíntesis. Este control dependiente de la luz de las enzimas del cloroplasto se ejerce mediante una pequeña proteína llamada tiorredoxina que puede presentarse tanto en forma reducida como oxidada. Como se indicó en la página 211, no todos los electrones que pasan a través de la ferredoxina se usan para reducir el $NADP^+$. De hecho, algunos de estos electrones se transfieren a la tiorredoxina. Una vez que ha aceptado un par de electrones, la tiorredoxina reduce ciertos puentes disulfuro (—S-S—) en grupos sulfhidrilo (—SH) en las enzimas del ciclo de Calvin seleccionadas (**FIGURA 6-21**). Este cambio covalente en la

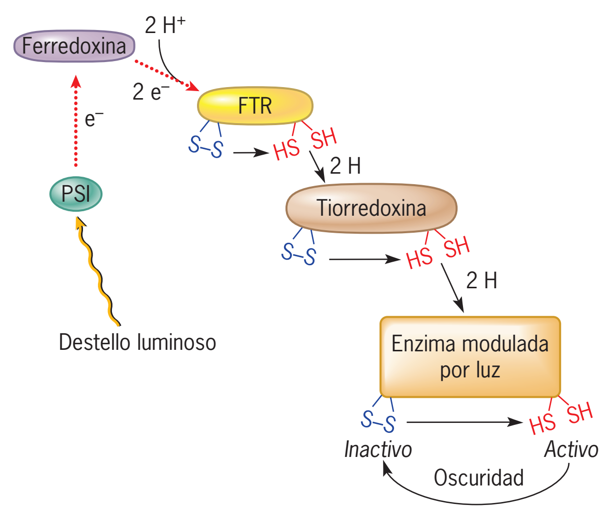



**FIGURA 6-21 Control redox del ciclo de Calvin.** Ante la luz, la ferredoxina se reduce, y una fracción de estos electrones se transfiere a la proteína pequeña tiorredoxina, que reduce los grupos disulfuro de ciertas enzimas del ciclo de Calvin, manteniéndolos en un estado activo. En la oscuridad, el flujo de electrones a la tiorredoxina cesa, los grupos sulfhidrilo de las enzimas reguladas se oxidan al estado disulfuro y las enzimas se inactivan.

estructura de la proteína activa estas enzimas, promoviendo la síntesis de carbohidratos en el cloroplasto. En la oscuridad, cuando la fotosíntesis ha cesado, la ferredoxina ya no reduce la tiorredoxina, y las enzimas del ciclo de Calvin vuelven a un estado oxidado (—S-S—) en el que están inactivas. También se puede observar que varias enzimas del ciclo de Calvin son mucho más activas a pH alcalino que a pH ácido. Este aumento de pH solo se produce en el estroma cuando este es iluminado y los protones se translocan al lumen tilacoide como resultado del transporte de electrones fotosintéticos (figura 6-16*b*). De estos hallazgos se deduce que la referencia a las reacciones del ciclo de Calvin como "reacciones oscuras" es un nombre inapropiado.

## Fotorrespiración

Uno de los puntos que aparecieron en los cromatogramas de los primeros trabajos de Calvin sobre las células de algas fue identificado como el compuesto glucolato, el cual fue ignorado (de manera correcta) al formular el ciclo de Calvin de la figura 6-19. Si bien el glucolato no es parte del ciclo de Calvin, es un producto de una reacción catalizada por el Rubisco. Aproximadamente 20 años después de que se descubrió que el Rubisco catalizaba la unión de $CO_2$ a RuBP, se descubrió que el Rubisco también catalizó una segunda reacción en la que el $O_2$ se une a RuBP para producir 2-fosfoglucolato (junto con PGA) (**FIGURA 6-22**). El fosfoglucolato se convierte posteriormente en glucolato por una enzima en el estroma. El glucolato producido en el cloroplasto se transfiere al peroxisoma y finalmente conduce a la liberación de $CO_2$ como se describe más adelante (véase **FIGURA 6-23**).

Debido a que involucra la absorción de $O_2$ y la liberación de $CO_2$, esta serie de reacciones se llama **fotorrespiración**. Debido a que la fotorrespiración conduce a la liberación de moléculas de $CO_2$ previamente fijadas, es un desperdicio de la energía de la planta. De hecho, la fotorrespiración puede explicar la pérdida de hasta 50% del dióxido de carbono recién fijado por las plantas de cultivo que crecen en condiciones cálidas y secas. Para comprender las razones de este fenómeno, debemos considerar un aspecto importante de la fisiología de las plantas. El problema más grave que enfrentan las plantas que viven en un clima cálido y seco es la pérdida de agua a través de las aberturas, llamadas estomas, en la superficie de sus hojas (figura 6-2). Aunque los estomas abiertos conducen a la pérdida de agua, también proporcionan el canal a través del cual el $CO_2$ ingresa a las hojas. Cuando está caliente y seco, las plantas $C_3$ cierran sus estomas, lo que evita la deshidratación. Pero el cierre de los estomas también evita el intercambio de gases, por lo que la concentración de $CO_2$ dentro de la hoja disminuye a medida que este se utiliza en el ciclo de Calvin, y la concentración de $O_2$ aumenta ya que el agua se divide por fotólisis. Cuando la concentración de $O_2$ es relativamente alta en comparación con la concentración de $CO_2$, la fotorrespiración se convierte en un problema grave. Como era de esperar, un esfuerzo concertado ha estado en marcha durante décadas para cultivar plantas que tienen menos probabilidades de participar en la fotorrespiración. Hasta el momento, estos esfuerzos no han tenido prácticamente ningún éxito.

Los estudios de la actividad enzimática del Rubisco purificado muestran que la enzima exhibe solo una modesta preferencia por el $CO_2$ como sustrato por encima del $O_2$. La razón de esta relativa falta de especificidad es que ni el $CO_2$ ni el $O_2$ se unen al sitio activo de la enzima (véase figura 3-11*a*). Por el contrario, la enzima se une a RuBP, que adopta la forma enediol que se muestra en la figura 6-22. Esta forma de RuBP puede ser atacada tanto por el $CO_2$ como por el $O_2$. Visto de esta manera, la fotorrespiración parece ser una consecuencia inevitable de las propiedades catalíticas del Rubisco, una enzima que se presume evolucionó en un momento en que los niveles de $O_2$ en la atmósfera eran prácticamente inexistentes. Bajo las actuales condiciones atmosféricas, el $O_2$ y el $CO_2$ compiten entre sí, y la dirección predominante de la reacción catalizada por Rubisco está determinada por la relación $CO_2/O_2$ que está disponible para la enzima. Cuando las plantas crecen en ambientes cerrados que contienen niveles elevados de $CO_2$ son capaces de un crecimiento mucho más rápido en virtud de sus tasas elevadas de fijación de $CO_2$. Se sugiere que el aumento de los niveles atmosféricos de $CO_2$ en el último siglo (alrededor de 270 partes por millón en 1870 a 397 ppm en 2014) es responsable de hasta 10% del aumento en el rendimiento de los cultivos

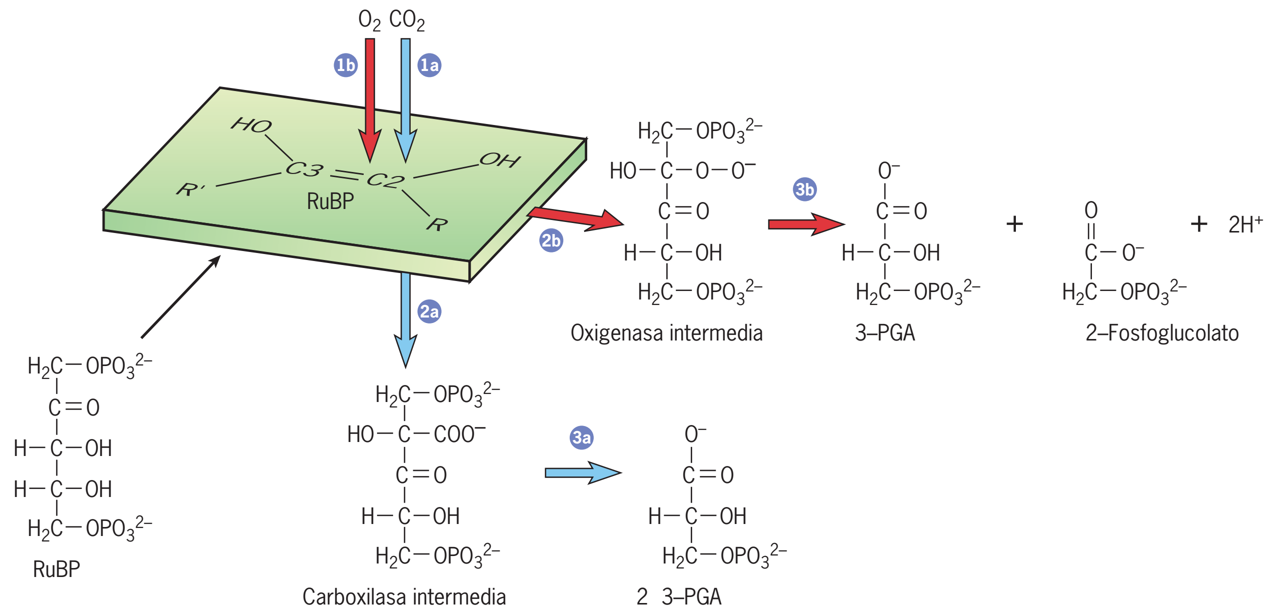



**FIGURA 6-22 Reacciones de la fotorrespiración.** El Rubisco puede catalizar dos reacciones diferentes con RuBP como sustrato (que se muestra en el estado enediol dentro del plano, véase figura 6-19*a*). Si RuBP reacciona con $O_2$ (paso 1b), la reacción produce una oxigenasa intermedia (paso 2b) que se descompone en 3-PGA y 2-fosfoglucolato (paso 3b). Las reacciones posteriores de fosfoglucolato se muestran en la figura 6-23. El resultado final de estas reacciones es la liberación de $CO_2$, una molécula que la célula había gastado previamente para fijar energía. Por el contrario, si la molécula de RuBP reacciona con $CO_2$ (paso 1a), la reacción produce una carboxilasa intermedia (paso 2a) que se descompone en dos moléculas de PGA (paso 3a), que continúan a lo largo del ciclo de Calvin.

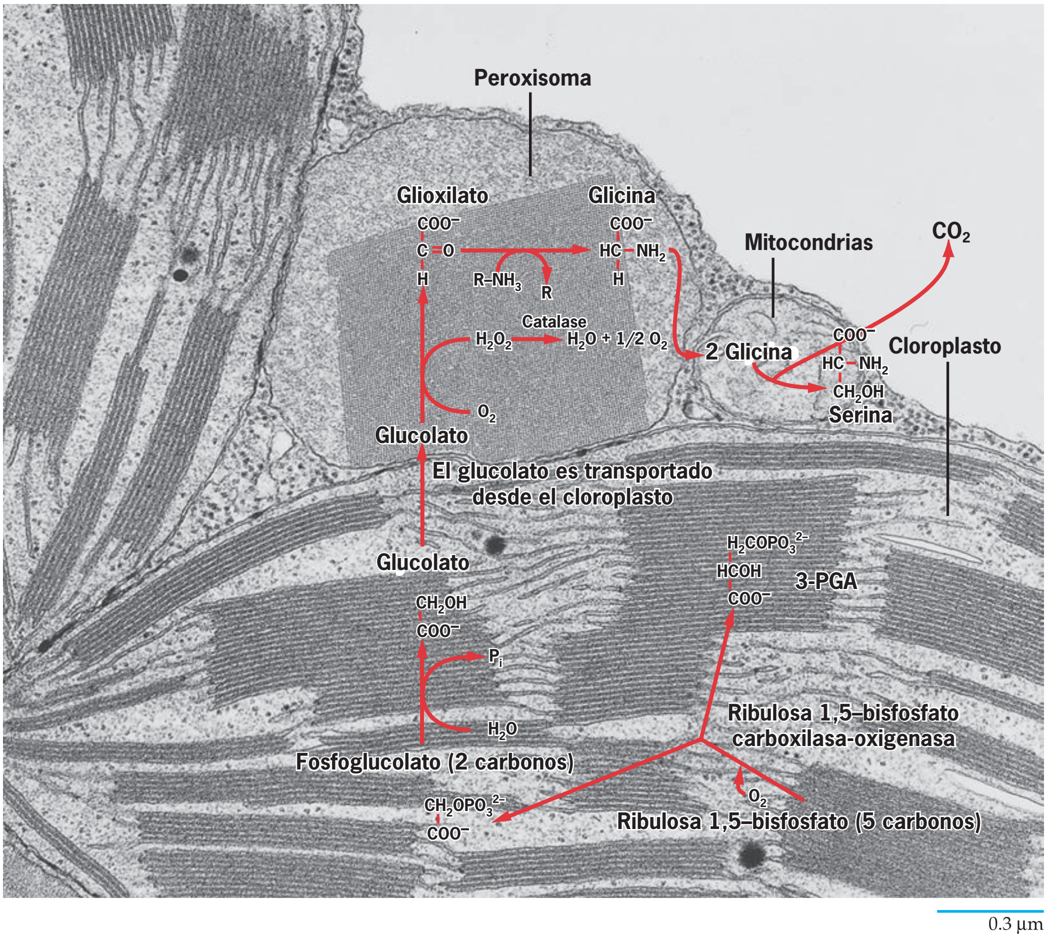



**FIGURA 6-23 Base celular de la fotorrespiración.** Microfotografía electrónica de una porción de una célula del mesófilo de la hoja de una planta de tabaco que muestra un peroxisoma (identificado por su núcleo cristalino) presionado contra un par de cloroplastos y cerca de una mitocondria. Las reacciones de la fotorrespiración que ocurren en cada uno de estos organelos se describen en el texto, y se muestran superpuestas sobre los organelos en los que se producen. Esta serie de reacciones se conoce como ciclo $C_2$. Los últimos pasos del ciclo —la conversión de serina a glicerato en el peroxisoma y luego a 3-PGA en el cloroplasto— no se muestran.

FUENTE: Tomada de Sue Ellen Frederick y Eldon H. Newcomb. *Journal of Cell Biology* 43:343-353, fig. 6, 1969. © Rockefeller University Press.

durante este periodo. Este incremento en la concentración atmosférica de $CO_2$ también se cree que es responsable del calentamiento global. Incluso un pequeño aumento en la temperatura de la Tierra podría tener efectos importantes en las condiciones mundiales, como un aumento en el nivel de los mares y una extensión de los desiertos del planeta, véase sección 6.11.

## Peroxisomas y fotorrespiración

Los peroxisomas son organelos citoplásmicos cuyo papel en el metabolismo oxidativo se analizó en la sección 5.10 del capítulo anterior. Los estudios sobre los peroxisomas de las células de las hojas han revelado un ejemplo sorprendente de interdependencia entre los diferentes organelos, una característica que a menudo se pierde en los estudios con estructuras celulares aisladas. La micrografía electrónica de la figura 6-23 muestra un peroxisoma de una célula foliar estrechamente apostado sobre la superficie de dos cloroplastos adyacentes y muy cerca de una mitocondria cercana. Esta disposición no es una coincidencia, sino que refleja una relación bioquímica subyacente según la cual los productos de un organelo sirven como sustratos en otro organelo. Las reacciones que tienen lugar en los diferentes organelos se superponen en la micrografía de la figura 6-23 y se resumen a continuación.

Se señaló antes que la fotorrespiración comienza cuando RuBP reacciona con $O_2$ para formar 3-PGA y un compuesto de dos carbonos, el fosfoglucolato (figura 6-22). Una vez formado, el fosfoglucolato se convierte en glucolato, que se expulsa del cloroplasto a un peroxisoma. En el peroxisoma, la enzima glucolato oxidasa convierte el glucolato en glioxilato, que luego puede convertirse en glicina y transferirse a las mitocondrias. En estas, dos moléculas de glicina (una molécula de dos carbonos) se convierten en una molécula de serina (una molécula de tres carbonos), con la liberación acompañante de una molécula de $CO_2$. Por tanto, por cada dos moléculas de fosfoglucolato producidas por Rubisco, un átomo de carbono que se había fijado previamente se pierde en la atmósfera. La serina producida en la mitocondria puede ser devuelta al peroxisoma y convertida en glicerato, que puede ser transportado al cloroplasto y utilizado en la síntesis de carbohidratos por medio de la formación de 3-PGA.

Dos grupos de plantas, llamadas plantas $C_4$ y plantas CAM, han superado los efectos negativos de la fotorrespiración gracias a la evolución de los mecanismos metabólicos que aumentan la relación $CO_2/O_2$ a la que están expuestas las moléculas de la enzima Rubisco.

**REPASO**

1. Describa el plan básico del ciclo de Calvin, indicando las reacciones que requieren energía. ¿Por qué se describe como un ciclo? ¿Por qué tiene que gastarse energía en este tipo de camino? ¿Cuáles son los productos eventuales de esta vía?

## 6.10 Síntesis de carbohidratos en plantas $C_4$ y plantas CAM



En 1965 Hugo Kortschak informó que cuando la caña de azúcar se alimentaba con $[^{14}C]O_2$, la radiactividad apareció primero en compuestos orgánicos que contenían esqueletos de cuatro carbonos, en lugar de la molécula PGA de tres carbonos encontrada en otros tipos de plantas. Un análisis posterior reveló que estos compuestos de cuatro carbonos (predominantemente oxalacetato y malato) eran el resultado de la combinación de $CO_2$ con fosfoenolpiruvato (PEP, *phosphoenolpyruvate*), y por tanto representaban un segundo mecanismo de fijación del dióxido de carbono atmosférico (**FIGURA 6-24**). La enzima responsable del enlace de $CO_2$ con PEP se denominó *fosfoenolpiruvato carboxilasa* y cataliza el primer paso de la **vía $C_4$**. Las plantas que utilizan esta vía se denominan **plantas $C_4$** y están representadas principalmente por hierbas tropicales. Antes de considerar el destino de este átomo de carbono recién fijado, es útil examinar las razones probables por las que ha evolucionado una vía alternativa de fijación de $CO_2$.

Cuando se coloca una planta $C_3$ en una cámara cerrada y se monitorea su actividad fotosintética, se encuentra que una vez que la planta reduce los niveles de $CO_2$ en la cámara a cerca de 50 partes por millón (ppm, *parts per million*), la tasa de liberación de $CO_2$ por fotorrespiración es igual a la tasa de fijación de $CO_2$ por fotosíntesis, por lo que la producción neta de carbohidratos se detiene. Por el contrario, una planta que utiliza la vía $C_4$ continúa la síntesis neta de carbohidratos hasta que los niveles de $CO_2$ han descendido a 1-2 ppm. Las plantas $C_4$ tienen esta capacidad debido a que la PEP carboxilasa continúa operando a niveles mucho más bajos de $CO_2$ que el Rubisco y no es inhibida por el $O_2$. Pero, ¿cuál es el valor de que una planta fije $CO_2$ a niveles tan bajos cuando la atmósfera invariablemente contiene $CO_2$ a niveles muy superiores a 300 ppm?

El valor de la ruta $C_4$ se hace evidente cuando estas se colocan en un ambiente seco y caluroso similar al que viven muchas de ellas. Las plantas $C_4$ están adaptadas a ambientes cálidos y áridos porque son capaces de cerrar sus estomas para evitar la pérdida de agua, y aun así son capaces de mantener una absorción de $CO_2$ suficiente para alimentar su actividad fotosintética a un ritmo máximo. Esta es la razón por la cual la digitaria, una planta $C_4$, tiende a apoderarse de un césped, desplazando las gramíneas domésticas $C_3$ originalmente plantadas. La caña de azúcar, el maíz y el sorgo son las plantas de cultivo más importantes que utilizan la vía $C_4$. Hay una desventaja para el metabolismo $C_4$: requiere más ATP y NADPH para producir carbohidratos que el metabolismo $C_3$. En consecuencia, en condiciones más frías y con buen drenaje, las plantas $C_3$ pueden competir con las plantas $C_4$ porque la fotosíntesis $C_3$ es más eficiente que la fotosíntesis $C_4$ cuando la fotorrespiración no es un problema. Como resultado, la mayoría de las plantas $C_4$ no funcionan tan bien en temperaturas más frías o latitudes más altas.

Cuando se sigue el destino del $CO_2$ fijado por medio de la ruta $C_4$, se descubre que el grupo $CO_2$ se libera pronto solo para ser recapturado por Rubisco y convertirse en intermedios metabólicos de la vía $C_3$ (figura 6-24). La base de este metabolismo aparentemente paradójico se hace evidente cuando se examina la anatomía foliar de una planta $C_4$. A diferencia de las plantas $C_3$, las hojas de las plantas $C_4$ contienen dos cilindros concéntricos de células. Un cilindro externo está hecho de *células mesófilas* y un cilindro interior de *células de la cubierta del haz* (figura 6-24). La fijación de $CO_2$ a PEP ocurre en las células del mesófilo externo. La actividad de PEP carboxilasa puede continuar, incluso cuando

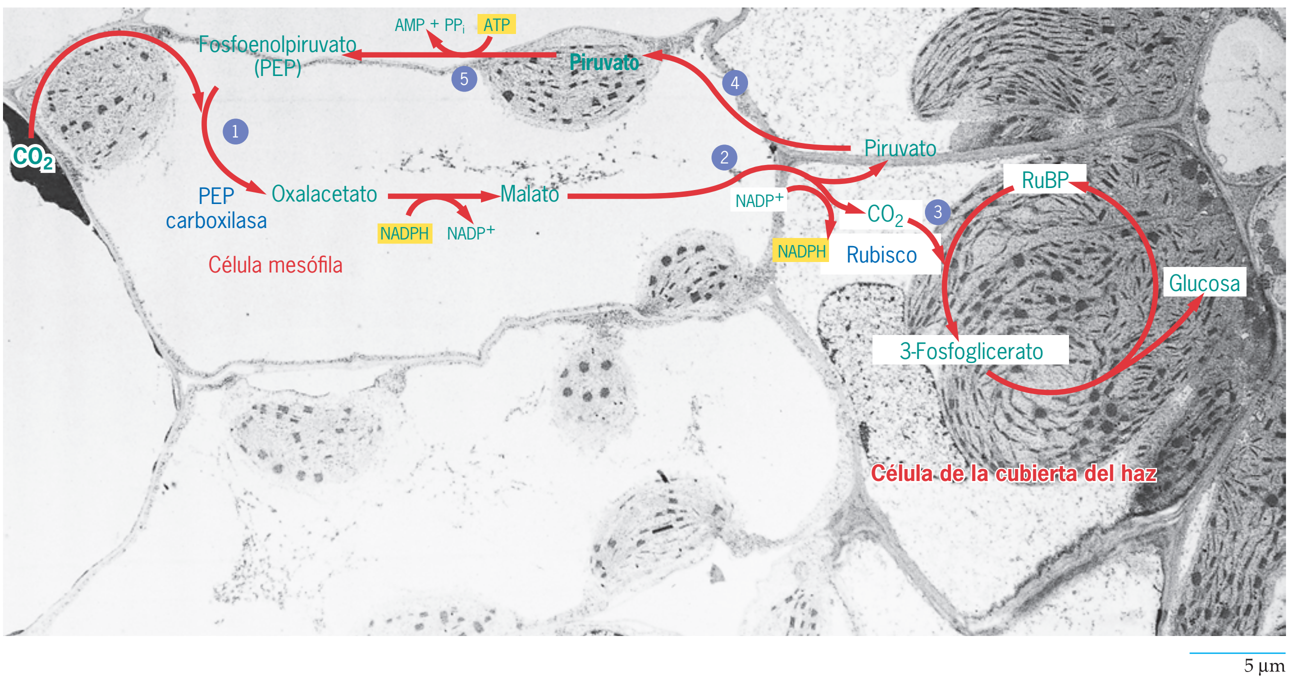



**FIGURA 6-24 Estructura y función de plantas $C_4$.** Micrografía electrónica de una sección transversal de la hoja de una planta $C_4$ que muestra la relación espacial entre el mesófilo y las células de la cubierta del haz. Las reacciones de fijación de $CO_2$ que ocurren en cada tipo de célula están superpuestas a la micrografía. En el paso 1, el $CO_2$ se une a PEP mediante la enzima PEP carboxilasa en una célula mesófila que se encuentra cerca del exterior de la hoja. El malato de cuatro carbonos formado por la reacción se transporta a la célula de la cubierta del haz más céntrica (paso 2), donde se libera el $CO_2$. El $CO_2$ se vuelve altamente concentrado en la célula de la cubierta del haz, favoreciendo la fijación de $CO_2$ por el Rubisco para formar 3-PGA (paso 3) que puede circular a través del ciclo de Calvin. El piruvato formado cuando se libera $CO_2$ se envía de vuelta a la celda del mesófilo (paso 4), donde se convierte en PEP. Aunque el proceso requiere la hidrólisis de ATP (paso 5), el alto contenido de $CO_2/O_2$ en la célula de la cubierta del haz minimiza la tasa de fotorrespiración.

FUENTE: Cortesía de S. Craig, CSIRO Plant Industry.

los estomas de la hoja están casi completamente cerrados y el nivel de $CO_2$ en las células es muy bajo. Una vez formados, los productos $C_4$ se transportan a través del plasmodesmo en la pared celular adyacente (véase figura 7-32) y dentro de las células de la cubierta del haz de pared gruesa, que están selladas de los gases atmosféricos. Una vez en las celdas de células de la cubierta del haz, el $CO_2$ previamente fijado se puede separar del transportador $C_4$ produciendo un alto nivel de $CO_2$ en estas células interiores, un nivel adecuado para la fijación por parte del Rubisco. Los niveles de dióxido de carbono en las células de la cubierta del haz pueden ser 100 veces mayores que en el mesófilo. Por tanto, la ruta $C_4$ proporciona un mecanismo para controlar la fijación de $CO_2$ mediante una vía menos eficiente de $C_3$ por el "bombeo" de $CO_2$ hacia la cubierta del haz. Una vez que el $CO_2$ se separa del compuesto de cuatro carbonos, el piruvato formado vuelve a las células del mesófilo para recargarse como PEP (figura 6-24). Además de ahorrar agua, las plantas que utilizan la vía $C_4$ son capaces de generar altas relaciones de $CO_2/O_2$ en el entorno local del Rubisco, favoreciendo así el proceso de fijación de $CO_2$ sobre el de la fotorrespiración. De hecho, los intentos de demostrar la fotorrespiración en las hojas intactas de las plantas $C_4$ fallan casi siempre.

Muchos eventos importantes en el curso de la evolución biológica, como la absorción de la bacteria que dio origen a las mitocondrias (página 26), se cree que ocurrieron en una sola ocasión. Es notable que las plantas $C_4$ hayan evolucionado de forma independiente de antepasados $C_3$ más de 45 veces en 19 familias diferentes. Los científicos de plantas están tratando de imitar este proceso evolutivo mediante la introducción de partes de la maquinaria fotosintética $C_4$ en las plantas $C_3$ con el objetivo de aumentar la productividad de los cultivos. Por ejemplo, el gen PEP carboxilasa del maíz (una planta $C_4$) se ha introducido en el arroz (una planta $C_3$) con la esperanza de crear un mecanismo concentrador de $CO_2$ dentro de las células del mesófilo del arroz donde se aloja el Rubisco. Algunos de los estudios de campo sobre estas plantas genéticamente modificadas han sido alentadores, pero es demasiado pronto para decir si los aumentos observados en la eficiencia fotosintética se deben a niveles aumentados de asimilación de $CO_2$, a niveles disminuidos de fotorrespiración, a mayor resistencia al estrés, o a algún otro mecanismo.

Muchas plantas del desierto, como los cactus, tienen otra adaptación bioquímica que les permite sobrevivir en hábitats muy cálidos y secos. Estas plantas se llaman **plantas CAM**, y utilizan PEP carboxilasa en la fijación de $CO_2$ atmosférico al igual que las plantas $C_4$. Sin embargo, a diferencia de las plantas $C_4$, las especies CAM llevan a cabo reacciones dependientes de la luz y fijación de $CO_2$ en diferentes momentos del día, en lugar de en diferentes células de la hoja. En otras palabras, la evolución ha seguido dos caminos diferentes para superar el problema que plantea la fotorrespiración, ya que disminuye la eficiencia fotosintética. Mientras que las plantas $C_3$ y $C_4$ abren sus estomas foliares y fijan el $CO_2$ durante el día, las plantas CAM mantienen sus estomas cerrados durante las horas de luz cálida y seca. Luego, por la noche, cuando la tasa de pérdida de vapor de agua se reduce en gran medida, abren sus estomas y fijan el $CO_2$ por medio de PEP carboxilasa. A medida que se fija más y más dióxido de carbono en las células del mesófilo durante la noche, el malato que se genera se transporta a la vacuola central de la célula. La presencia de malato (en forma de ácido málico dentro de la vacuola ácida) es evidente por el "sabor matutino" ácido de las plantas. Durante las horas diurnas, los estomas se cierran y el ácido málico se traslada al citoplasma. Allí abandona su $CO_2$, que puede ser fijado por el Rubisco en las condiciones de baja concentración de $O_2$ que existe cuando los estomas están cerrados. Los carbohidratos luego se sintetizan utilizando la energía de ATP y NADPH generados por las reacciones dependientes de la luz.

**REPASO**

1. Describa las principales diferencias estructurales y bioquímicas entre las plantas $C_3$, $C_4$ y CAM. ¿Cómo afectan estas diferencias la capacidad de las plantas para crecer en climas cálidos y secos?

## 6.11 PERSPECTIVA HUMANA

### Calentamiento global y secuestro de carbono

La superficie de la Tierra, tanto terrestre como acuática, se ha estado calentando constantemente desde 1900. Por ejemplo, los 10 años más calurosos registrados en la historia han sucedido después de 1997. Esta tendencia de calentamiento general se conoce como "calentamiento global", y plantea una grave amenaza para el medio ambiente y el bienestar humano. ¿Qué está causando este aumento de la temperatura? El $CO_2$ atmosférico ha estado en constante aumento durante el último siglo, de modo que la cantidad total de $CO_2$ en el aire ha aumentado en 30% desde los tiempos preindustriales. Este $CO_2$ adicional se genera quemando combustibles fósiles como carbón, petróleo o gas. Por ejemplo, la combustión completa de una molécula de octano (un ingrediente principal en la gasolina) produce ocho moléculas de $CO_2$. El $CO_2$ es un llamado "gas de efecto invernadero", el nombre surge del hecho de que el $CO_2$ puede absorber y volver a emitir luz infrarroja. Cuando la luz del sol golpea la Tierra, parte de la energía de la luz visible se reirradia desde la superficie de la Tierra en forma de luz infrarroja, gran parte de la cual se irradia hacia el espacio. Pero los gases de efecto invernadero como el $CO_2$ capturan esta energía infrarroja y la vuelven a emitir de regreso a la superficie de la Tierra, calentando así la atmósfera, la tierra y los océanos. Esta captura de calor es similar a la forma en que los paneles de vidrio en un invernadero mantienen el calor, permitiendo que las plantas crezcan durante los meses de invierno en climas fríos, por lo que el efecto del $CO_2$ se denomina efecto invernadero.

Hay varios gases de efecto invernadero importantes, incluidos el vapor de agua, el $CO_2$ y el metano. Aunque los gases de efecto invernadero se producen naturalmente, el advenimiento de la industrialización a gran escala ha llevado a que estos gases estén presentes en la atmósfera a niveles nunca antes vistos. Sabemos que esto es cierto sobre la base de las mediciones de estos gases en muestras de núcleos de hielo que datan de cientos de miles de años. Entonces, dado que los gases de efecto invernadero conducen a un calentamiento de la superficie de la Tierra, y dado que la cantidad de estos gases ha estado aumentando de manera constante como resultado de nuestro uso de combustibles fósiles, se ha inferido que nuestras propias actividades industriales han contribuido a una gran parte de la tendencia observada del calentamiento global. ¿Podríamos detener el calentamiento global produciendo menos gases de efecto invernadero? Solo en Estados Unidos la producción

(*continúa*)

anual de $CO_2$ es de alrededor de 6 mil millones de toneladas métricas, de las cuales la mitad se genera a partir de fuentes estacionarias como plantas de energía eléctrica y fábricas de cemento. El resto se genera quemando los llamados combustibles de transporte, a saber, gasolina, diesel y combustible para aviones. Cambiar nuestro sistema de transporte para usar coches eléctricos reduciría las emisiones de $CO_2$ por los propios vehículos, pero al final esta es solo una solución parcial porque la electricidad para manejar esos autos todavía necesita ser producida por algún tipo de planta de energía, probablemente una que quema combustibles fósiles. La única razón por la cual un cambio así sería parcialmente útil es que las grandes centrales estacionarias se pueden hacer más eficientes que los pequeños motores de gasolina en los automóviles, debido a las inversiones de ingeniería necesarias para que los motores de los autos sean pequeños y livianos.

Las fuentes alternativas de energía, como la nuclear, la solar y la eólica, podrían tener un gran efecto en la reducción de las emisiones de $CO_2$, pero solo si se realizan en una escala extremadamente grande. La energía nuclear, que siempre ha sido una solución controvertida, se ha vuelto significativamente menos popular después del desastre nuclear de Fukushima Daiishi en 2011, lo que generó serias preocupaciones sobre la seguridad. Los biocombustibles (véase el inicio de este capítulo) a veces se discuten en el contexto del calentamiento global, pero en este caso uno debe ser muy cuidadoso dependiendo del tipo de combustible que se produce. Algunos esfuerzos para desarrollar biocombustibles están dirigidos a la producción de hidrógeno, que sería un combustible altamente deseable desde una perspectiva de emisión de efecto invernadero porque la combustión de hidrógeno no produce ningún $CO_2$. Por otro lado, no parece muy probable que toda nuestra infraestructura industrial y de transporte se pueda cambiar a hidrógeno en el corto plazo. La mayor parte del trabajo en biocombustibles está dirigido a la producción de largas cadenas de hidrocarburos que serían equivalentes en todos los aspectos a los combustibles fósiles existentes, como el diesel o la gasolina. Cuando el biodiesel se quema, produce tanto $CO_2$ como el combustible diesel derivado del petróleo crudo.

Afortunadamente, la producción de $CO_2$ es solo la mitad de la historia. Al igual que con cualquier equilibrio químico, la concentración en estado estacionario de $CO_2$ en la atmósfera depende no solo de qué tan rápido se está produciendo, sino también de qué tan rápido se consume. La fotosíntesis representa la principal forma en que el $CO_2$ se elimina de la atmósfera. Como hemos visto en este capítulo, los fotosistemas I y II absorben los fotones de la luz solar y los utilizan para mover protones y electrones a través de la membrana tilacoide. Luego, el gradiente de protones así formado se usa para producir ATP a través de la $CF_1CF_o$ ATP sintasa, y este ATP se usa para convertir el $CO_2$ en 3-fosfoglicerato (PGA) en el ciclo de Calvin. El PGA puede usarse para hacer otros carbohidratos. Los carbohidratos producidos en las plantas mediante la fotosíntesis se almacenan dentro de la planta, y algunos se transportan hacia las raíces, donde pueden filtrarse hacia el suelo. El resultado neto de estos procesos es un flujo constante de carbono desde el $CO_2$ en la atmósfera hasta los carbohidratos en el suelo. Esta transferencia de $CO_2$ de la atmósfera, donde actúa como un gas de efecto invernadero, a los carbohidratos en el suelo donde no contribuyen al calentamiento global, es una forma de "`secuestro de carbono", que significa secuestrar el carbono de la atmósfera y trasladarlo a una ubicación más inocua. Dada la lentitud con que crecen las plantas, uno podría pensar que esta ruta para el secuestro de carbono debe ser bastante insignificante en comparación con la explosión masiva de producción de $CO_2$ de los generadores de energía de todo el mundo, pero hay que recordar que las plantas cubren gran parte de la Tierra. Incluso si una planta determinada solo captura una pequeña cantidad de carbono por año, la masa total de plantas en todos los bosques del mundo puede tener un impacto sustancial. De hecho, cuando uno considera cuánto carbono se almacena en la atmósfera en comparación con el suelo, hay cerca del doble del almacenado en el suelo. Pero a medida que aumentan las poblaciones humanas, los bosques están siendo diezmados, y esto significa que el flujo de carbono hacia fuera de la atmósfera, impulsado por la fotosíntesis, ha ido disminuyendo constantemente, incluso cuando nuestra producción de $CO_2$ ha aumentado debido al consumo ampliado de combustible. De hecho, la deforestación se considera hoy como un contribuyente principal al calentamiento global, a la par de la combustión de combustibles fósiles. Por tanto, las discusiones sobre cómo combatir el calentamiento global deben considerar enfoques geopolíticos para prevenir y revertir la deforestación y no solo para ver cómo quemar el petróleo de manera más eficiente.

Los biocombustibles pueden tener un papel en el secuestro de carbono, porque aunque producen combustibles que generan $CO_2$ cuando se queman, la producción del combustible consumirá $CO_2$. Por ejemplo, se están desarrollando métodos para extraer el $CO_2$ de las centrales eléctricas estacionarias y alimentarlo en estanques de algas que luego fijarían el $CO_2$ en carbohidratos. En última instancia, como se discutió anteriormente, los biocombustibles producirían $CO_2$ cuando se quemaran, pero sería $CO_2$ del que ya se había recogido de la quema de otro combustible. En este sentido, los biocombustibles de algas alimentadas con $CO_2$ industrial se consideran "carbono neutral". Por lo menos, esta Perspectiva humana debería convencerle de que reducir los gases de efecto invernadero es un problema complejo que requerirá no solo soluciones de ingeniería para reducir la producción de $CO_2$, sino también soluciones agrícolas y ecológicas para aumentar la captura de $CO_2$ por el suelo forestal. Esto planteará un gran desafío para la próxima generación de científicos y de diseñadores de políticas.

# Preguntas analíticas

1. ¿Cuál de los dos fotosistemas funciona con el potencial redox más negativo? ¿Cuál genera el agente reductor más fuerte? ¿Cuál debe absorber cuatro fotones durante cada ronda de fotofosforilación no cíclica?
2. ¿Qué tipo de planta ($C_3$, $C_4$ o CAM) podría esperarse que respondiera mejor si se expone a luz diurna continua en condiciones de calor y sequedad? ¿Por qué?
3. De las siguientes sustancias, $PQH_2$, citocromo $b_6$ reducido, ferredoxina reducida, $NADP^+$, NADPH, $O_2$ y $H_2O$, ¿cuál es el agente reductor más fuerte? ¿Cuál es el agente oxidante más fuerte? ¿Cuál tiene la mayor afinidad por los electrones? ¿Cuál tiene los electrones más energéticos?
4. Suponga que debe agregar el desacoplador dinitrofenol [DNP (*dinitrophenol*), página 187] a una preparación de cloroplastos que lleva a cabo la fotosíntesis. ¿Cuál de las siguientes actividades esperaría ver afectada? 1) absorción de luz, 2) fotofosforilación cíclica, 3) transporte de electrones entre PSII y PSI, 4) fotofosforilación no cíclica, 5) síntesis de PGA, 6) reducción de $NADP^+$.
5. Calcule la fuerza generada por los protones que se formarían a través de una membrana tilacoide que mantiene una diferencia de 10 000 veces en $[H^+]$ y sin diferencia de potencial eléctrico. (La ecuación para la fuerza generada por los protones se encuentra en la página 186). Dado lo que usted sabe acerca de la fotosíntesis, ¿qué lado de la membrana tilacoide (lumen o estroma) es el que tiene la mayor concentración de protones?, (véase **video tutorial cuantitativo**).
6. ¿Bajo qué condiciones esperarías que una planta se involucre más en la fotofosforilación cíclica?
7. Contraste el cambio que ocurre en el pH del medio cuando los cloroplastos aislados llevan a cabo la fotosíntesis en compara-

ción con las mitocondrias aisladas que llevan a cabo la respiración aeróbica.

8. Se señaló en el capítulo anterior que la mayoría de la fuerza generada por los protones en las mitocondrias se expresa como un voltaje. Por el contrario, la fuerza generada por los protones durante la fotosíntesis se expresa casi de manera exclusiva como un gradiente de pH. ¿Cómo puede explicar estas diferencias?
9. Contraste los roles del PSI y el PSII en la generación del gradiente electroquímico a través de la membrana tilacoide.
10. ¿Estarías de acuerdo en que una planta $C_3$ tiene que gastar más energía por molécula de $CO_2$ convertida en carbohidratos que una planta $C_4$? ¿Por qué o por qué no?
11. En la fotosíntesis, la captura de energía luminosa trae como resultado la liberación y la posterior transferencia de electrones. ¿De qué moléculas son los electrones originalmente derivados? ¿En qué moléculas residen estos electrones?
12. ¿Cuántas moléculas de ATP y NADPH se requieren en la vía de $C_3$ para producir un azúcar de seis carbonos? Si la síntesis de una molécula de ATP requiriera cuatro protones, ¿esperaría que estos requisitos relativos para ATP y NADPH pudieran cumplirse mediante fotofosforilación no cíclica en ausencia de fotofosforilación cíclica?
13. Si la feofitina y la $A_0$ (una molécula de clorofila *a*) son los principales aceptores de electrones de PSII y PSI, respectivamente, ¿cuáles son los principales donantes de electrones de cada fotosistema?
14. Compare los roles de tres átomos metálicos diferentes en las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis.
15. ¿Esperaría que el efecto invernadero (un aumento en el contenido de $CO_2$ de la atmósfera) tuviese un mayor efecto sobre las plantas $C_4$ o las plantas $C_3$? ¿Por qué?
16. ¿Esperaría que el contenido de agua de la atmósfera fuese un factor importante en el éxito de una planta $C_3$? ¿Por qué?
17. Se ha sugerido que los bajos niveles de $CO_2$ desempeñan un papel clave para mantener los niveles de $O_2$ estables en 21%. ¿Cómo es posible que los niveles de $CO_2$ puedan afectar los niveles de $O_2$ en la atmósfera?
18. Supongamos que los niveles de $CO_2$ subieran a 600 ppm, que de hecho probablemente fueron así hace unos 300 millones de años. ¿Qué efecto supondrías que esto podría tener con respecto a la competencia entre las plantas $C_3$ y $C_4$?
19. Suponga que debe colocar una planta $C_3$ en condiciones cálidas y secas, y proporcionarle $^{18}O_2$ marcado radiactivamente. ¿En qué compuestos podría encontrar este marcador incorporado?

CAPÍTULO 7

# Interacciones entre las células y su entorno

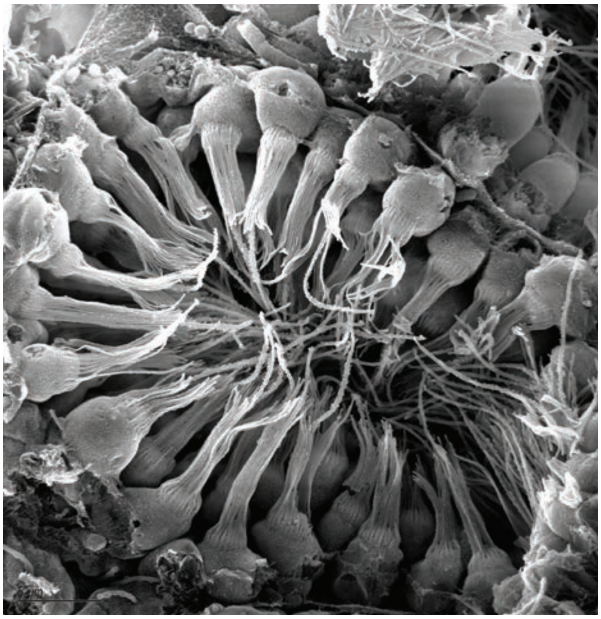


Imagen de microscopía electrónica de barrido de una cámara de coanocitos, el aparato de alimentación especializado de algunas esponjas. La similitud morfológica entre el coanoflagelado no metazoario y las células de coanocitos de la esponja (un metazoo) condujo a los investigadores a formular la hipótesis de que los coanoflagelados pueden ser parientes cercanos de los metazoos y podrían proporcionar una idea de cómo se produjo la multicelularidad en los animales. (Scott A. Nicols http://nicholslab.wikidot.com/research)
FUENTE: Cortesía de Scott Nichols.

## LA EVOLUCIÓN DE LOS ORGANISMOS MULTICELULARES

Se cree que la vida más antigua en la Tierra se originó hace tres mil millones de años en la forma de organismos simples, unicelulares. Durante más de mil millones de años, la vida unicelular prosperó, con algunos linajes, como los eucariotas, y creció en complejidad molecular y celular. La evidencia fósil sugiere que la vida animal multicelular más temprana —los metazoos— evolucionó hace unos 600 millones de años.

¿Qué desencadenó el aumento de los metazoos? A los cambios ambientales, como un aumento del oxígeno atmosférico, se atribuye el repentino estallido de diversidad evolutiva que comenzó hace unos 1 500 millones de años. También se piensa que la depredación desempeñó una función clave en la evolución de la multicelularidad, debido a que los organismos multicelulares más grandes podrían ser capaces de engullir e ingerir a sus vecinos unicelulares más pequeños. Independientemente de la causa, está claro que se necesitaron varias innovaciones para la transición de la vida unicelular a la multicelular. Algunos de los requisitos más básicos fueron la capacidad de las células para reconocerse, adherirse y comunicarse entre sí. ¿Cómo surgieron estos comportamientos en los primeros metazoos?

La secuenciación del genoma ha dado una idea de este rompecabezas evolutivo. Los estudios de organismos unicelulares primitivos, como los coanoflagelados, ampliamente consi-

(*continúa*)

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**7.1** Resumen de interacciones extracelulares
**7.2** Matriz extracelular
**7.3** Componentes de la matriz extracelular
**7.4** Propiedades dinámicas de la matriz extracelular
**7.5** Integrinas
**7.6** Anclaje de células a su sustrato
**7.7** Interacciones de las células con otras células
**7.8** **PERSPECTIVA HUMANA:** La función de la adhesión celular en la inflamación y metástasis
**7.9** Uniones adherentes y desmosomas
**7.10** Función de los receptores de adhesión celular en la señalización transmembrana
**7.11** Uniones estrechas: sello del espacio extracelular
**7.12** Uniones gap y plasmodesmos: mediación de la comunicación intercelular
**7.13** **VÍAS EXPERIMENTALES:** Función de las uniones gap en la comunicación intercelular
**7.14** Paredes celulares

derados como uno de los parientes no metazoarios vivos más cercanos de los animales, han sido particularmente esclarecedores. La secuenciación del genoma del coanoflagelado *Monosiga brevicollis* reveló que numerosas moléculas implicadas en la adhesión celular, la señalización y la formación de la matriz extracelular estaban presentes antes del ascenso del linaje de los metazoos. Se considera que estas moléculas pueden haber sido utilizadas por organismos premetazoarios unicelulares para detectar y unirse a células presas o a un sustrato inmóvil. Con el tiempo, los eventos de duplicación del genoma permitieron la diversificación de genes, lo que condujo a moléculas que podrían asumir una variedad de funciones novedosas en la nueva evolución de la organización del filo metazoos.

## 7.1 Resumen de interacciones extracelulares

Aunque la membrana plasmática constituye el límite entre una célula viva y su ambiente inerte, los materiales que se encuentran fuera de la membrana plasmática desempeñan una función importante en la vida de una célula. La mayoría de las células en una planta o animal multicelular están organizadas en tejidos claramente definidos en los que las células componentes mantienen una relación definida entre sí y con los materiales extracelulares que se encuentran entre ellas. Incluso aquellas células que no tienen una relación fija dentro de un tejido sólido, como los glóbulos blancos que custodian el cuerpo, deben interactuar de maneras altamente específicas con otras células y con los materiales extracelulares con los que entran en contacto. Estas interacciones regulan actividades tan diversas como la migración, el crecimiento y la diferenciación celular, y determinan la organización tridimensional de los tejidos y órganos que surge durante el desarrollo embrionario.

Este capítulo se centra en el entorno extracelular de las células y los tipos de interacciones en las que participan las células. En la **FIGURA 7-1** se muestra una sección esquemática de la piel humana y se describen de manera general varios de los temas que se discuten en el capítulo. La capa externa de la piel (la epidermis) es un tipo de **tejido epitelial**. Al igual que otros epitelios, que recubren los espacios y las superficies libres del cuerpo, la epidermis consiste en gran parte en células estrechamente unidas entre sí y a una capa no celular subyacente mediante uniones especializadas (representada en el recuadro superior de la figura 7-1). Estos contactos proporcionan un mecanismo para que las células se adhieran y se comuniquen entre sí. Por el contrario, la capa más profunda de la piel (la dermis) es un tipo de **tejido conectivo**. Al igual que otros tejidos conectivos, como los que forman un tendón o un cartílago, la dermis consiste principalmente en material extracelular, que incluye una variedad de fibras distintas que interactúan entre sí de maneras específicas. Una mirada más cercana a una de las células dispersas (los fibroblastos) de la dermis muestra que la superficie externa de la membrana plasmática contiene receptores que median las interacciones entre la célula y los componentes de su entorno (representados en el recuadro inferior de la figura 7-1). Estos receptores de la superficie celular interactúan no solo con el medio externo, sino que están conectados en su extremo interno a varias proteínas citoplásmicas. Los receptores con este tipo de conexión dual son adecuados para transmitir mensajes entre una célula y su entorno.

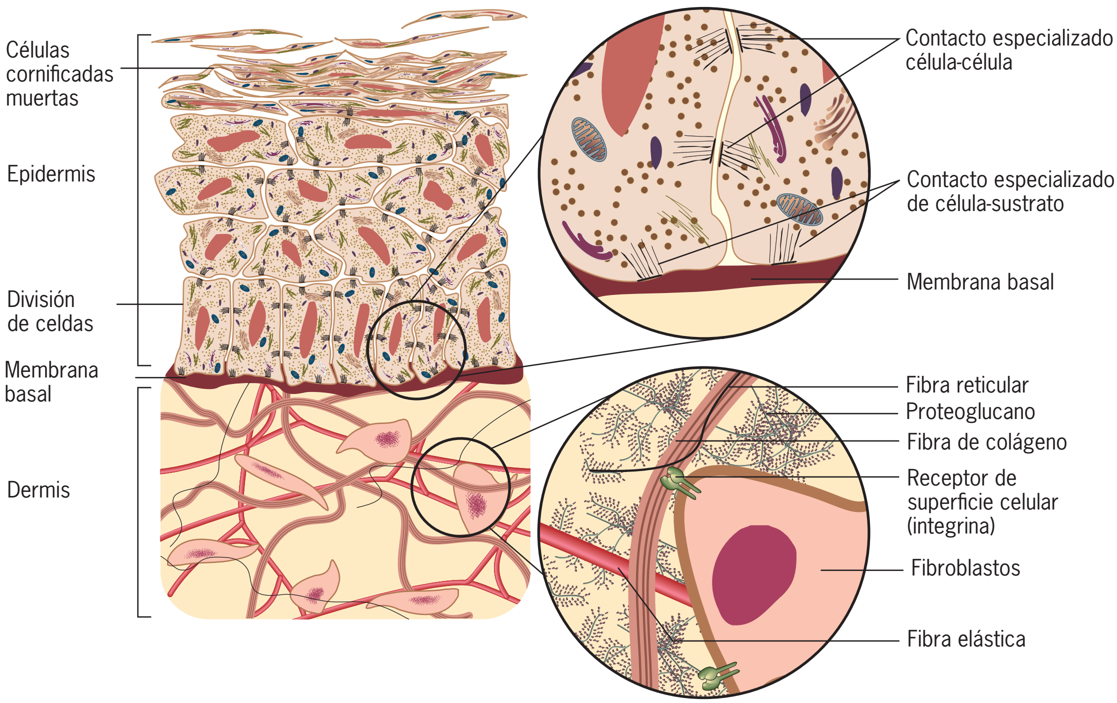



**FIGURA 7-1 Resumen de la organización de las células en tejidos y de la interacción entre ellas y con su entorno extracelular.** En este diagrama esquemático de una sección a través de la piel humana, se observa que las células de la epidermis se adhieren entre sí mediante contactos especializados. La capa basal de células epidérmicas también se adhiere a una capa no celular subyacente (la membrana basal). La dermis consiste en gran parte de elementos extracelulares que interactúan entre sí y con las superficies de células dispersas (principalmente los fibroblastos). Las células contienen receptores que interactúan con materiales extracelulares y transmiten señales al interior de la célula.

Si se comienza en la membrana plasmática y se mueve hacia afuera, se pueden examinar los tipos de elementos extracelulares que rodean a varios tipos de células. En el capítulo 4 se observó que prácticamente todas las proteínas de membrana integrales, así como ciertos lípidos de membrana, contienen cadenas de azúcares (los oligosacáridos) de longitud variable que se proyectan hacia afuera desde la membrana plasmática (véase figura 4-4*a*). Estas proyecciones de carbohidratos forman parte del **glucocálix** (o *recubrimiento celular*) en la superficie externa de la membrana plasmática (consúltese **FIGURA 7-2*a***). Esta capa es muy prominente en algunos tipos de células, como las células epiteliales que recubren el tracto digestivo de los mamíferos (consúltese figura 7-2*b*). Se considera que el glucocálix media las interacciones célula-célula y célula-sustrato, proporciona protección mecánica a las células, actúa como una barrera para las partículas que se mueven hacia la membrana plasmática y une importantes factores reguladores que actúan sobre la superficie celular (véase figura 7-2*c*).

Muchos tipos de células animales producen una **matriz extracelular (ECM**, *extracelular matrix*): una red organizada de moléculas secretadas que proporciona andamiaje a las células y tejidos que rodea (véase **FIGURA 7-3**). La ECM es más que un material de empaque inerte o un pegamento no específico que mantiene unidas las células; proporciona señales físicas, bioquímicas y mecánicas que pueden desempeñar funciones reguladoras clave para determinar la forma y las actividades de la célula. Por ejemplo, la digestión enzimática de la ECM que rodea las células del cartílago cultivadas o las células epiteliales de las glándulas mamarias provoca una marcada disminución en las actividades sintéticas y secretoras de las células. La adición de materiales de matriz extracelular de vuelta a la placa de cultivo puede restaurar el estado diferenciado de las células y su capacidad para fabricar sus productos celulares habituales.

Una de las matrices extracelulares mejor definidas es la **membrana basal** (o lámina basal), una lámina continua de 50 a 200 nm de espesor que 1) rodea las fibras nerviosas, los músculos y las células grasas; 2) subyace a la superficie basal de los tejidos epiteliales, como la epidermis de la piel (obsérvense figuras 7-1 y 7-4*a*-*b*), o el revestimiento de los tractos digestivo y respiratorio, y 3) subyace al revestimiento endotelial interno de los vasos sanguíneos. Las membranas basales proporcionan soporte mecánico para las células unidas, generan señales que mantienen la supervivencia celular, sirven como un sustrato para la migración celular, separan los tejidos adyacentes dentro de un órgano y actúan como una barrera para el paso de las macromoléculas. En esta última capacidad, las membranas basales de los capilares desempeñan una función importante en la prevención del paso de proteínas fuera de la sangre y hacia los tejidos. Esto es particularmente importante en el riñón, donde la sangre se filtra a alta presión a través de una membrana basal de doble capa que separa los capilares del glomérulo de la pared de los túbulos renales. La insuficiencia renal en los diabéticos a largo plazo puede ser el resultado de un engrosamiento anormal de las membranas basales que rodean los glomérulos. Las membranas basales también sirven como una barrera para la invasión de tejidos por células cancerígenas. La organización molecular de las membranas basales se discute más adelante (véase figura 7-12). Aquellas células que no se encuentran en una lámina de membrana basal, como los fibroblastos de un tejido conectivo, suelen estar rodeadas por una ECM menos organizada que consiste principalmente en fibrillas filiformes (véase **FIGURA 7-4c**).

Aunque la matriz extracelular puede tomar diversas formas en diferentes tejidos y organismos, tiende a estar compuesta de macromoléculas similares. A diferencia de la mayoría de las proteínas que están dentro de las células, que son moléculas globulares compactas, las del espacio extracelular son por lo general especies *fibrosas* extendidas. Estas proteínas se secretan en el espacio extracelular donde son capaces de autoensamblarse en una red tridimensional interconectada, que se representa en la **FIGURA 7-5** y se analiza en las siguientes secciones. Entre sus diversas funciones, las proteínas de la ECM sirven como marcadores de camino, andamios, vigas, alambre y pegamento. Como se observa a lo lar-

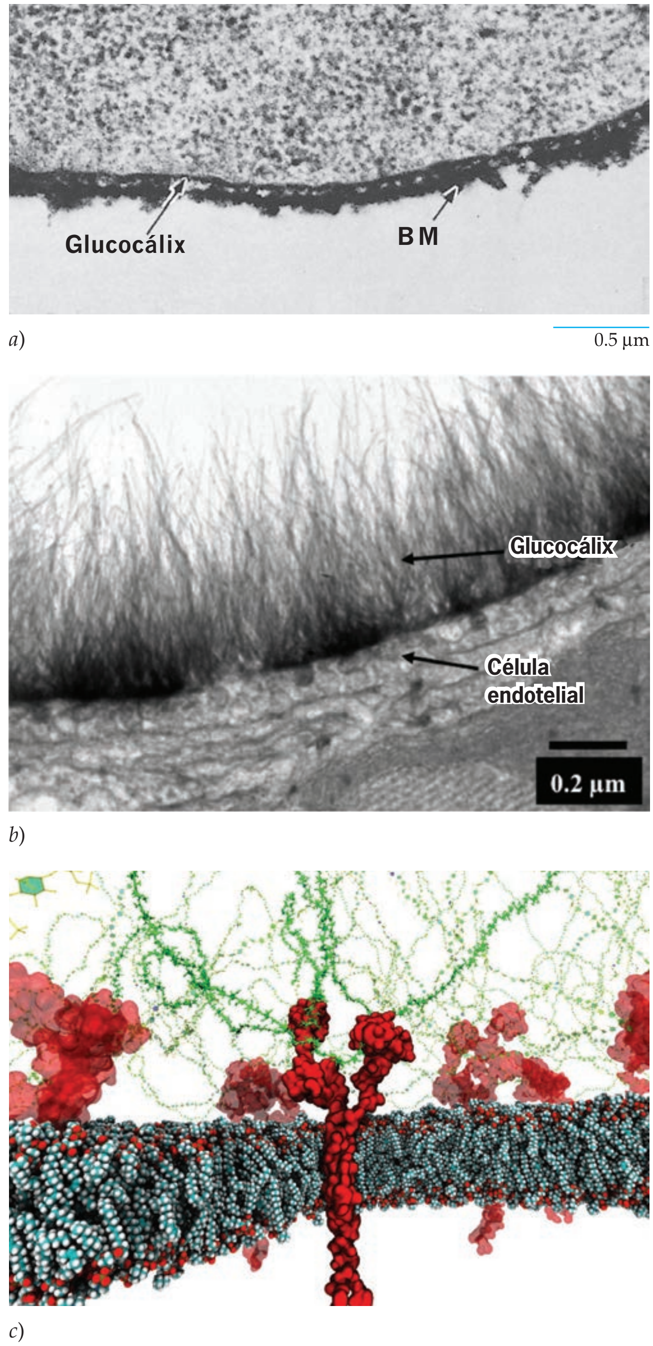
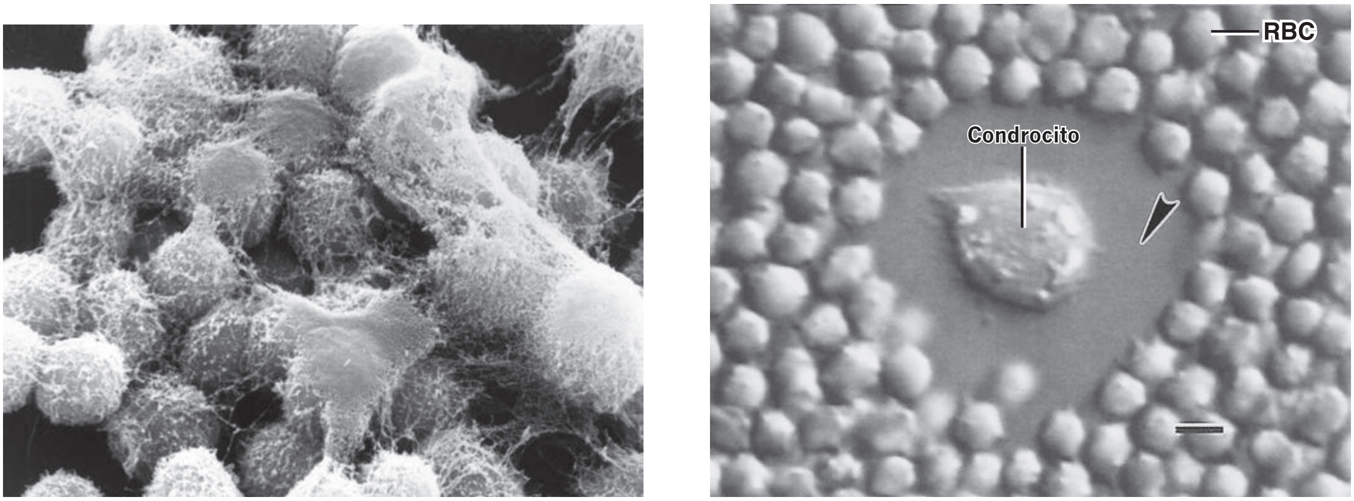



**FIGURA 7-2 Glucocálix.** *a*) Superficie basal de una célula ectodérmica de un embrión de pollo de poco tiempo. Se pueden distinguir dos estructuras distintas estrechamente aplicadas a la superficie externa de la célula: un glucocálix (GC, *glycocalix*) interno y una membrana basal (BM, *basement membrane*) externa. *b*) Micrografía electrónica del glucocálix endotelial en un capilar coronario, que muestra glucocálix extenso. *c*) Modelo molecular del glucocálix. Las cadenas de azúcar se muestran en verde, unidas a la proteína transmembrana en rojo.

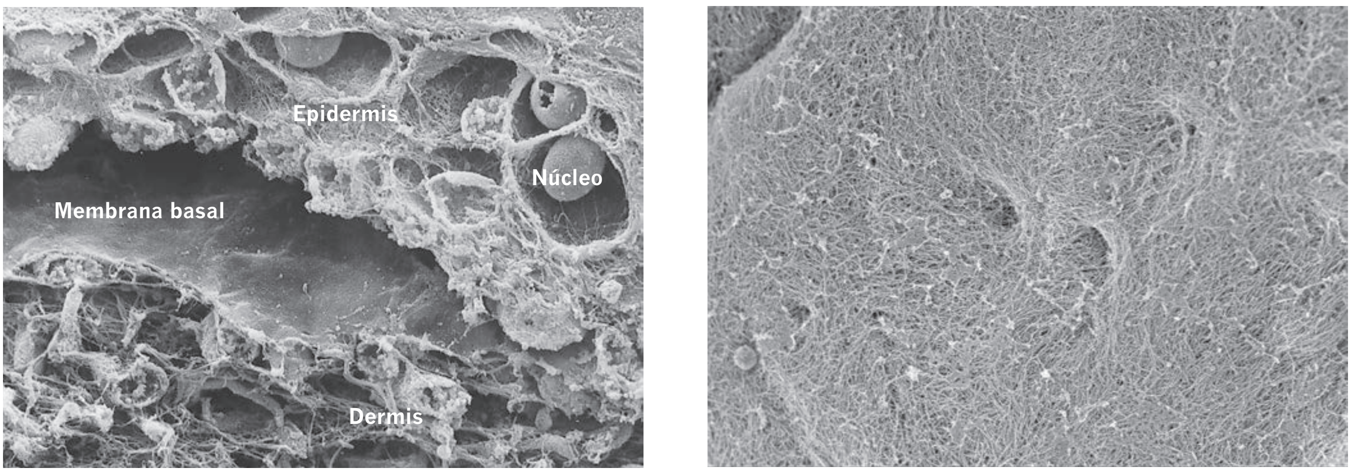
FUENTE: *a*) Tomada de A Martinez-Palomo. *Int Rev Cytol* 1970;29:64. © 1970, con permiso de Elsevier; *b*) por cortesía de B. M. van den Berg. Laboratorio de Einthoven para medicina vascular, División de Nefrología, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Leiden, Países Bajos; *c*) cortesía de Igor Pivkin, *et al*. Università della Svizzera italiana. *Biophys Revista* 2014;106(1):232-234, con permiso de Elsevier.



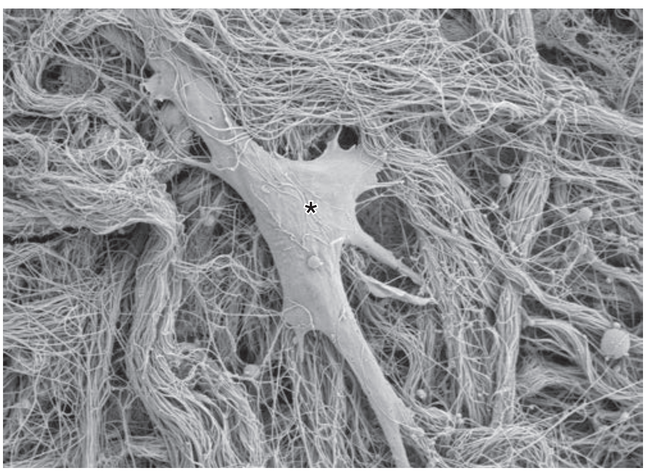

*a*) *b*)

**FIGURA 7-3 Matriz extracelular (ECM) de las células del cartílago.** *a*) Micrografía electrónica de barrido de una porción de una colonia de células de cartílago (condrocitos) que muestra los materiales extracelulares secretados por las células. *b*) La ECM de un único condrocito se ha hecho visible mediante la adición de una suspensión de células de glóbulos rojos (RBC, *red blood cells*). El grosor de la ECM es evidente por el espacio libre (punta de flecha) que no está penetrado por los RBC. La barra representa 10 µm.

FUENTE: *a*) Cortesía de Michael Solursh y Gerald Karp; *b*) cortesía de Greta M. Lee, Brian Johnston, Ken Jacobson y Bruce Caterson.




*a*) 10 µm *b*)




*c*)

**FIGURA 7-4 Membrana basal (lámina basal).** *a*) Micrografía electrónica de barrido de la piel humana. La epidermis se ha separado de parte de la membrana basal, que es visible debajo de las células epidérmicas. *b*) La red densa de colágeno de la membrana basal se revela por EM de barrido después de la separación enzimática de la epidermis. *c*) La red de colágeno mucho más flexible de la dermis es visible aquí, con un fibroblasto adherente marcado con un asterisco.

FUENTE: *a*) Cortesía de Karen Holbrook; *b*) reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd. Stoitzner P., Pfaller K., Stössel H. Close-Up View of Migrating Langerhans Cells in the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 2002;118:117-125; *c*) reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd. Stoitzner P., Pfaller K., Stössel H. Close-Up View of Migrating Langerhans Cells in the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 2002;118:117-125.

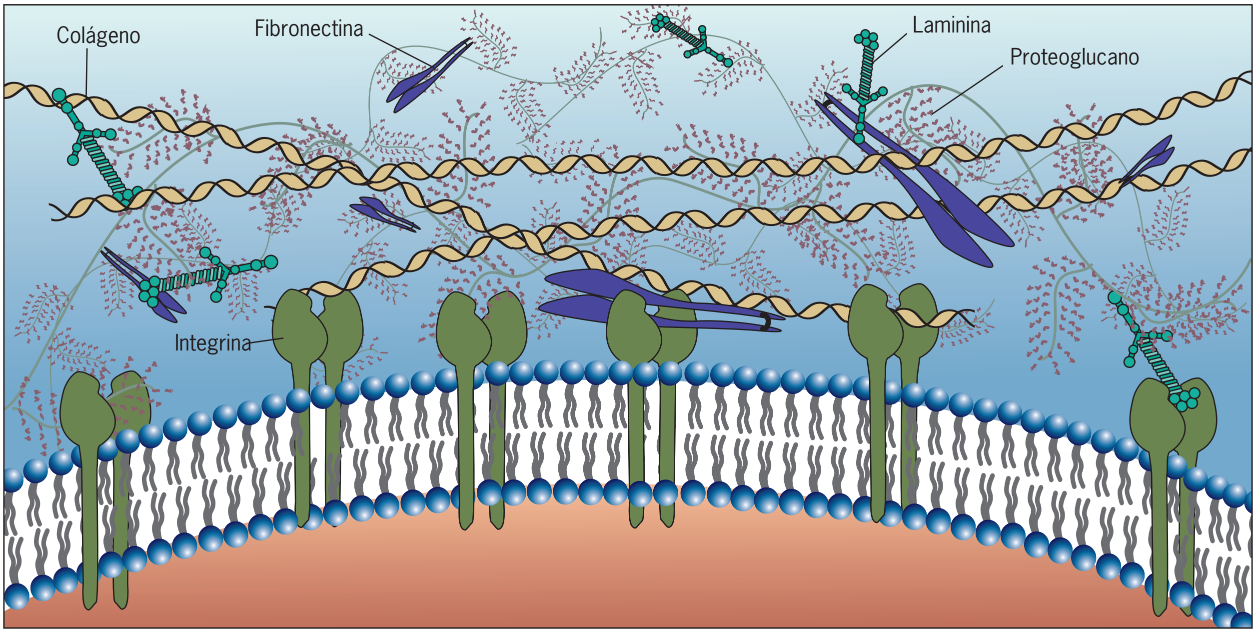



**FIGURA 7-5 Una visión general de la organización macromolecular de la matriz extracelular.** Las proteínas y polisacáridos que se muestran en esta ilustración se discutirán en las siguientes secciones. Las proteínas representadas (fibronectina, colágeno y laminina) contienen sitios de unión entre sí, así como sitios de unión para receptores (integrinas) que se encuentran en la superficie de la célula. Los proteoglucanos son enormes complejos proteicos que ocupan gran parte del volumen del espacio extracelular.

go de la siguiente discusión, las alteraciones en la secuencia de aminoácidos de las proteínas extracelulares pueden conducir a trastornos graves. Se comenzará con una de las moléculas más importantes y ubicuas de la ECM, el colágeno glucoproteico.

**REPASO**

1. Distinga entre el glucocálix, una membrana basal y la matriz extracelular del tejido del cartílago.

## 7.3 Componentes de la matriz extracelular

Los principales componentes de las matrices extracelulares incluyen colágenos, proteoglucanos y una variedad de proteínas, como la fibronectina y la laminina. Cada una de las proteínas de la matriz extracelular contiene sitios de unión entre sí y para los receptores en la superficie celular. Como resultado, estos diversos materiales extracelulares interactúan para formar una red interconectada que se une a la superficie de la célula.

### Colágeno

Los **colágenos** comprenden una familia de glucoproteínas fibrosas que están presentes solo en las matrices extracelulares. Los colágenos se encuentran en todo el reino animal y se destacan por su alta resistencia a la tracción, es decir, su resistencia a las fuerzas de tracción. Se estima que una fibra de colágeno de 1 mm de diámetro es capaz de suspender un peso de 10 kg (22 lb) sin romperse. El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano —constituye más de 25% de todas las proteínas—, un hecho que refleja la presencia generalizada de materiales extracelulares.

El colágeno se produce principalmente por los fibroblastos, células que se encuentran en varios tipos de tejidos conectivos, pero también por las células del músculo liso y las células epiteliales. Hasta la fecha, se han identificado 28 tipos distintos de colágeno humano. Cada tipo de colágeno está restringido a ubicaciones particulares dentro del cuerpo, pero dos o más tipos diferentes a menudo están presentes juntos en la misma ECM. Se proporciona una complejidad funcional adicional al mezclar varios tipos de colágeno dentro de la misma fibra. Estas fibras "heterotípicas" son el equivalente biológico de una aleación de metal. Es probable que diferentes propiedades estructurales y mecánicas resulten de distintas mezclas de colágenos en las fibras. Aunque hay muchas diferencias entre los miembros de la familia del colágeno, todos comparten al menos dos características estructurales importantes. 1) Todas las moléculas de colágeno son trímeros que constan de tres cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α. 2) A lo largo de al menos una parte de su longitud, las tres cadenas polipeptídicas de una molécula de colágeno se enrollan una alrededor de la otra para formar una triple hélice en forma de varilla (véase **FIGURA 7-6*a***). Las cadenas α de moléculas de colágeno contienen grandes cantidades de prolina, y muchos de los residuos de prolina (y lisina) se hidroxilan después de la síntesis del polipéptido. Los aminoácidos hidroxilados son importantes para mantener la estabilidad de la triple hélice mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas componentes. La deficiencia para hidroxilar cadenas de colágeno tiene serias consecuencias para la estructura y la función de los tejidos conectivos. Esto se aprecia en los síntomas del escorbuto, una enfermedad que resulta de una deficiencia de vitamina C (ácido ascórbico) y se caracteriza por encías inflamadas y pérdida de dientes, cicatrización deficiente, huesos frágiles y debilitamiento del revestimiento de los vasos sanguíneos que causa sangrado interno. Las enzimas que agregan grupos hidroxilo a la lisina y a los aminoácidos de prolina del colágeno requieren ácido ascórbico como coenzima.

Varios colágenos, incluidos los tipos I, II y III, se describen como *colágenos fibrilares* porque se ensamblan en fibrillas rígidas tipo cable, que a su vez se empaquetan en fibras más gruesas que son por lo general lo suficientemente grandes como para verse en el microscopio óptico. El envase lateral de las filas de moléculas de colágeno I dentro de una fibrilla de colágeno se representa en la figura 7-6*b, c*). Las fibrillas se fortalecen mediante enlaces cruzados covalentes entre residuos de lisina e hidroxilisina en las moléculas de colágeno adyacentes. Este proceso de reticulación continúa durante toda la vida y puede contribuir a la disminución de la elasticidad de la piel y al aumento de la fragilidad de los huesos entre los ancianos. Estudios recientes que investigan la superficie de las fibrillas de colágeno sugieren que están compuestas de hebras que se retuercen alrededor del eje de la fibrilla para formar

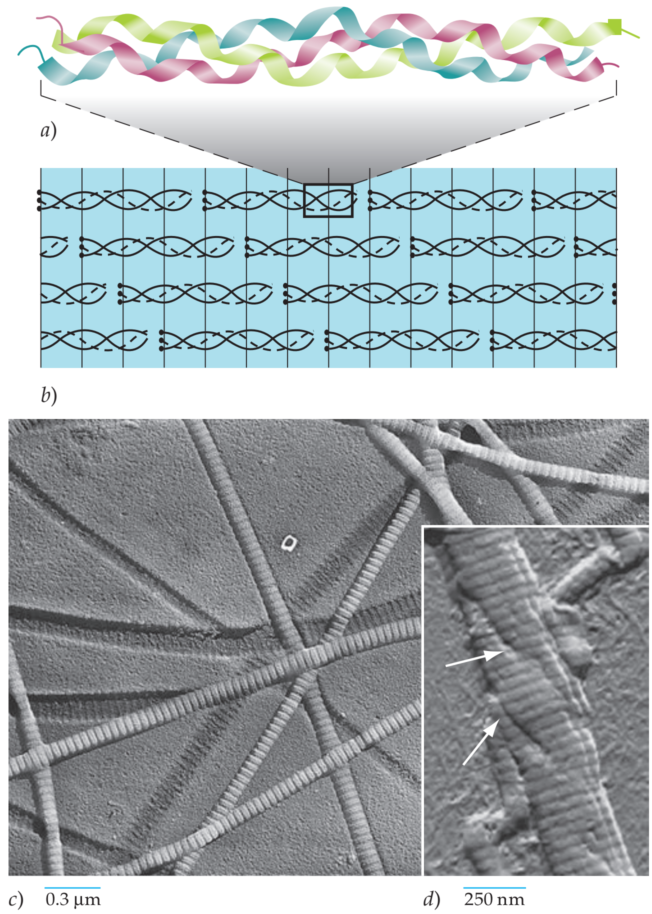



**FIGURA 7-6 Estructura del colágeno I.** Esta figura representa varios niveles de organización de un colágeno fibrilar. *a*) La molécula de colágeno (o monómero) es una triple hélice compuesta de tres cadenas α helicoidales. Algunos tipos de colágeno contienen tres cadenas α idénticas y, por tanto, son homotrímeras, mientras que otros son heterotrímeros que contienen dos o tres cadenas diferentes. Cada molécula de colágeno I tiene 295 nm de longitud. *b*) Las moléculas de colágeno I se alinean en filas en las que las moléculas en una fila están escalonadas en relación con las de la fila vecina. Un paquete de moléculas de colágeno I, como el que se muestra aquí, forma una fibrilla de colágeno. La disposición escalonada de las moléculas produce bandas (líneas negras horizontales en la ilustración) a través de la fibrilla que se repiten con una periodicidad de 67 nm (que es igual a la longitud del espacio entre las moléculas más la superposición). *c*) Se observa una micrografía electrónica de fibrillas de colágeno humano con sombreado metálico (véase figura 18-17). El patrón de bandas de las fibrillas es evidente. *d*) Una micrografía de fuerza atómica que muestra la superficie de una fibrilla de colágeno que sugiere que sus subcomponentes están retorcidos en espiral alrededor del eje de la fibrilla como una cuerda. El patrón de bandas sigue siendo evidente. Las flechas apuntan a lugares donde la fibrilla está ligeramente desenrollada, como ocurriría si se tuviera que torcer una cuerda en la dirección opuesta a la que está torcida.

FUENTE: *c*) Cortesía de Jerome Gross y Francis O. Schmitt; De Laurent Bozec, *et al*. *Biophys J* 200792:71. © 2007, con permiso de Elsevier. *d*) De Laurent Bozec, *et al*. *Biophys J* 200792:71. © 2007, con permiso de Elsevier.

una estructura que se parece más a una cuerda de tamaño nanométrico que a un cable (consúltese figura 7-6*d*).

Entre los diversos componentes de la ECM, las moléculas de colágeno proporcionan el marco insoluble que determina muchas de las propiedades mecánicas de la matriz. De hecho, las propiedades de un tejido en particular a menudo se pueden correlacionar con la organización tridimensional de sus moléculas de colágeno. Por ejemplo, los tendones, que conectan los músculos con los huesos, deben resistir tremendas fuerzas de tracción durante los momentos de contracción muscular. Los tendones contienen una ECM en la que las fibrillas de colágeno se alinean paralelas al eje longitudinal del tendón y, por tanto, paralelas a la dirección de las fuerzas de tracción. La córnea es también un tejido notable; debe servir como una capa duradera y protectora en la superficie del globo ocular, pero también debe ser transparente para que la luz pueda pasar a través de la lente hacia la retina. La capa media y gruesa de la córnea es el estroma, que contiene fibrillas de colágeno relativamente cortas que se organizan en distintas capas. La estructura estratificada del estroma es similar a la de la madera contrachapada: las fibrillas de cada capa son paralelas a otras fibrillas en la capa pero casi perpendiculares a las fibrillas en la capa de cada lado (véase **FIGURA 7-7**). Esta estructura similar a la madera contrachapada proporciona resistencia a este delicado tejido, mientras que la uniformidad de tamaño y el empaque ordenado de las fibrillas minimizan la dispersión de los rayos de luz entrantes, lo que promueve la transparencia del tejido.

Dada su abundancia y distribución generalizada, no es sorprendente que las anomalías en la formación de colágeno fibrilar conduzcan a trastornos graves. Las quemaduras o lesiones traumáticas de los órganos internos pueden llevar a la acumulación de tejido cicatricial, que consiste principalmente en colágeno fibrilar. Una condición común descrita como *fibrosis* es el resultado de la producción excesiva de tejido conectivo que contiene colágeno. La fibrosis ocurre con mayor frecuencia en los pulmones (fibrosis pulmonar) y en el hígado (cirrosis) donde el tejido cicatricial que contiene colágeno reemplaza gradualmente al tejido normal del órgano. Las mutaciones en los genes que codifican el colágeno tipo I pueden producir *osteogénesis imperfecta*, una enfermedad potencialmente mortal que se caracteriza por huesos extremadamente frágiles, piel delgada y tendones débiles. Las mutaciones en los genes que codifican colágeno tipo II alteran las propiedades del tejido del cartílago y causan enanismo y deformidades esqueléticas. Las mutaciones en varios otros genes de colágeno pueden conducir a una variedad de defectos distintos pero relacionados en la estructura de la matriz de colágeno (denominados *síndromes de Ehler-Danlos*). Las personas con uno de estos síndromes tienen articulaciones hiperflexibles y una piel altamente extensible.

No todos los colágenos forman fibrillas. Uno de los colágenos no fibrilares es el tipo IV, cuya distribución está restringida a las membranas basales.

Las membranas basales son láminas delgadas y de soporte, y las moléculas de colágeno tipo IV están organizadas en una red

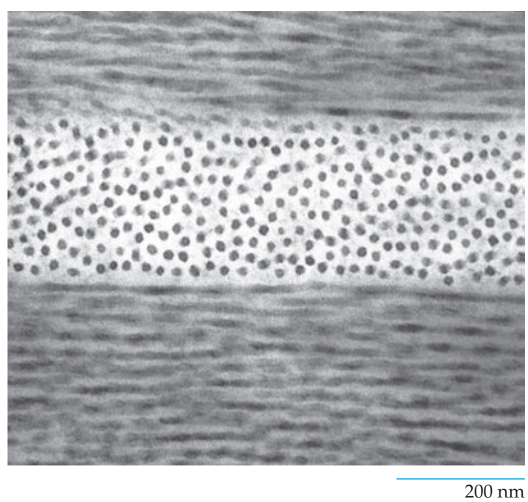



**FIGURA 7-7 Estroma corneal.** Consiste principalmente en capas de fibrillas de colágeno de diámetro y espaciamiento uniformes. Las moléculas de capas alternas están dispuestas en ángulo recto entre sí, asemejándose a la estructura de la madera contrachapada.

FUENTE: De Nigel J. Fullwood. *Structure* 2004;12:169, fig. 1; © 2004, con permiso de Elsevier.

que proporciona soporte mecánico y sirve como un retículo para la deposición de otros materiales extracelulares (véase figura 7-12). A diferencia del colágeno tipo I, que consiste en una triple hélice larga e ininterrumpida, el trímero de colágeno tipo IV contiene segmentos no helicoidales intercalados a lo largo de la molécula y los dominios globulares en cada extremo. Los segmentos no helicoidales hacen que la molécula sea flexible, mientras que los extremos globulares sirven como sitios de interacción entre las moléculas que le dan al complejo su carácter reticular (consúltese **FIGURA 7-8**). Se han identificado mutaciones en genes de colágeno tipo IV en pacientes con *síndrome de Alport*, una enfermedad renal hereditaria en la que se altera la membrana basal glomerular (véase figura 7-4*b*).

## Proteoglucanos

Además del colágeno, las membranas basales y otras matrices extracelulares contienen generalmente grandes cantidades de un tipo distintivo de complejo proteína-polisacárido llamado **proteoglucano**. Un proteoglucano (véase **FIGURA 7-9*a***) consiste en una molécula de proteína central (mostrada en negro en la figura 7-9*a*) a la cual se unen de forma covalente cadenas de *glicosaminoglicanos* (GAG, *glycosaminoglycans*) (que se muestran en rojo en la figura). Cada cadena de glicosaminoglicanos está compuesta de un disacárido repetitivo; es decir, tiene la estructura -A-B-A-B-, donde A y B representan dos azúcares diferentes. Los GAG son muy ácidos debido a la presencia de grupos sulfato y carboxilo unidos a los anillos de azúcar (consúltese figura 7-9*b*). Los proteoglucanos de la matriz extracelular se pueden ensamblar en complejos gigantescos mediante el enlace de sus proteínas centrales a una molécula de *ácido hialurónico*, un GAG no sulfatado (véase figura 7-9*c*). La apariencia microscópica de uno de estos complejos, que puede ocupar un volumen equivalente al de una célula bacteriana, se muestra en la figura 7-9*d*).

Debido a las cargas negativas soportadas en los GAG sulfatados, los proteoglucanos se unen a un gran número de cationes,

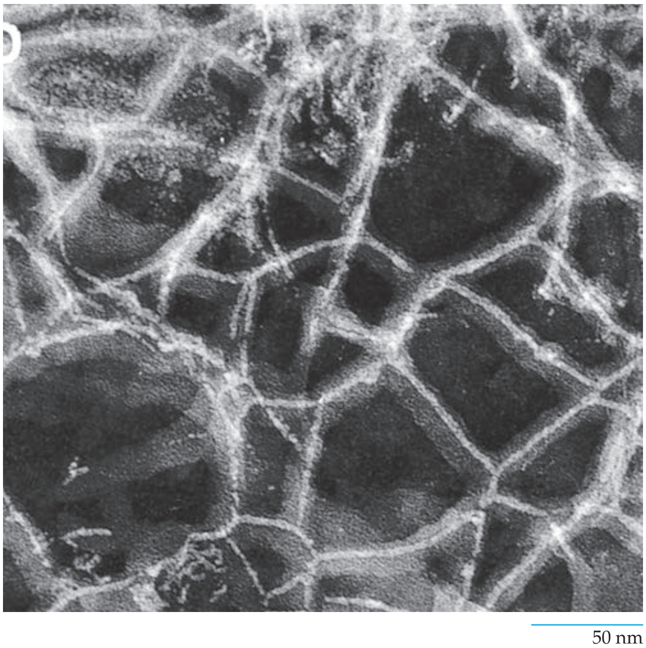



**FIGURA 7-8 Red de colágeno tipo IV de la membrana basal.** Micrografía electrónica de una membrana basal del tejido amniótico humano que se había extraído con una serie de soluciones salinas para eliminar los materiales no colágenos. El tratamiento deja una extensa red poligonal ramificada de hebras que forman un reticulado irregular. La evidencia indica que este reticulado consiste en moléculas de colágeno tipo IV unidas covalentemente entre sí en un conjunto tridimensional complejo. Un modelo del andamio de membrana basal se muestra en la figura 7-12.

FUENTE: De Peter D. Yurchenco y George C. Ruben. *J Cell Biol* 1987;105:2561, fig. 1d. © 1987, reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Imagen cortesía de Peter D. Yurchenco, Robert Wood Johnson Medical School.

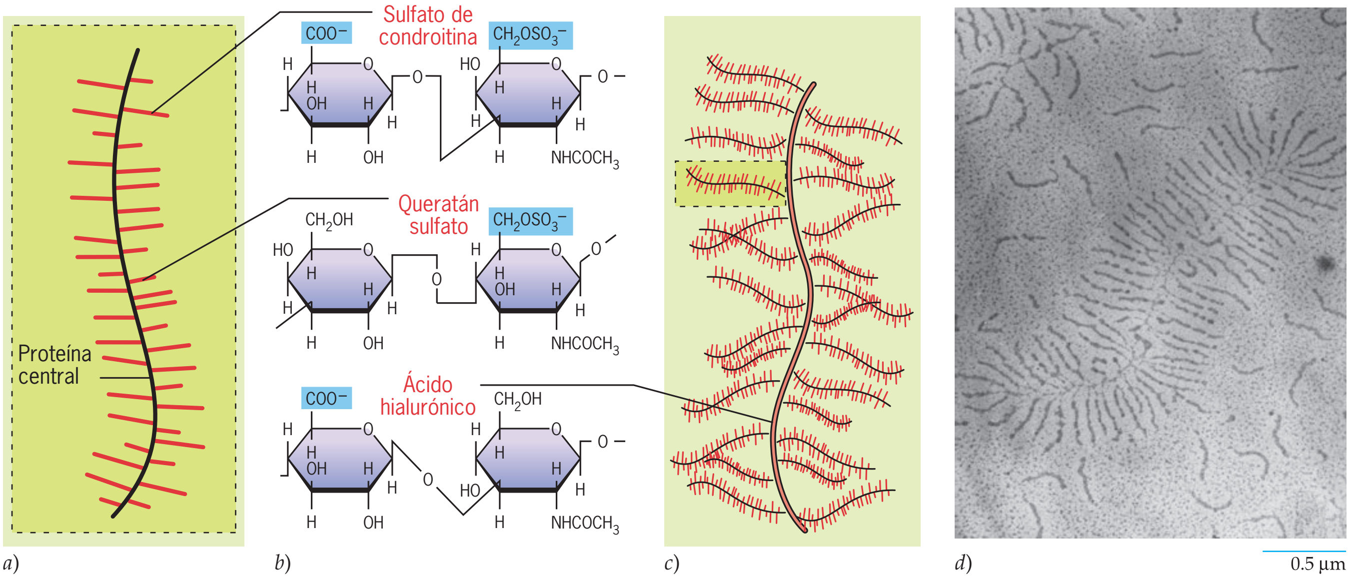



**FIGURA 7-9 Estructura de un complejo de proteoglucanos de tipo cartílago.** *a*) Representación esquemática de un único proteoglucano que consiste en una proteína central a la que están unidas un gran número de cadenas de glicosaminoglicanos (GAG, mostrada en rojo). Un proteoglucano de matriz de cartílago (p. ej., agrecano) puede contener aproximadamente 30 cadenas de queratán sulfato y 100 de sulfato de condroitina. Los proteoglucanos encontrados en las membranas basales (p. ej., perlecan y agrina) tienen solo unas pocas cadenas de GAG unidas a la proteína del núcleo. *b*) Estructuras de los disacáridos repetidos que componen cada uno de los GAG mostrados en esta figura. Todos los GAG soportan grandes cantidades de cargas negativas (indicadas por el sombreado azul). *c*) En la matriz del cartílago, los proteoglucanos individuales se unen a un GAG no sulfatado, denominado ácido hialurónico (o hialuronato), para formar un complejo gigante con una masa molecular de aproximadamente 3 millones de daltones. El recuadro indica uno de los proteoglucanos del tipo que se muestra en la parte *a*). *d*) Micrografía electrónica de un complejo de proteoglucanos, comparable a la ilustrada en la parte *c*), que se aisló de la matriz del cartílago.

FUENTE: *d*) Cortesía de Joseph A. Buckwalter.

que a su vez se unen a gran cantidad de moléculas de agua. Como resultado, los proteoglucanos forman un gel poroso e hidratado que llena el espacio extracelular como material de empaque (consúltese figura 7-5) y resiste las fuerzas de aplastamiento (compresión). Esta propiedad complementa la de las moléculas de colágeno adyacentes, que resisten las fuerzas de tracción y proporcionan un andamiaje para los proteoglucanos. Juntos, los colágenos y los proteoglucanos proporcionan al cartílago y a otras matrices extracelulares, fortaleza y resistencia a la deformación. La matriz extracelular del hueso también está compuesta de colágeno y proteoglucanos, pero se endurece por impregnación con sales de fosfato de calcio. Tanto los GAG sulfatados como los no sulfatados se toman de manera extendida como suplementos de salud con el objetivo de mejorar la condición de la piel y las articulaciones.

Además de su función estructural, se cree que los proteoglucanos también desempeñan una función importante en la señalización célula-célula. Se ha encontrado que varios factores de crecimiento se unen a los proteoglucanos, incluidos el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Se ha postulado que la ECM puede actuar como un "receptor" para los factores de crecimiento y otras moléculas de señalización, lo que permite la formación de un gradiente de señalización estable.

## Fibronectina

El término *matriz* implica una estructura compuesta por una red de componentes que interactúan. El término ha demostrado ser muy apto para la matriz extracelular, que contiene varias proteínas, además de colágeno y proteoglucanos, que interactúan entre sí de maneras muy específicas (véase figura 7-5). La *fibronectina*, como muchas otras proteínas que se analizan en este capítulo, consiste en una matriz lineal de distintos "bloques de construcción" o dominios, que le da a cada polipéptido una construcción modular (véase figura 7-10*a*). Cada polipéptido de fibronectina se construye a partir de una secuencia de aproximadamente 30 dominios Fn, dos de los cuales están representados en el recuadro superior de la **FIGURA 7-10*a***). Si bien los dominios de tipo Fn se descubrieron por primera vez en la fibronectina, se encuentran como parte de muchas otras proteínas, desde factores de coagulación sanguínea hasta receptores de membrana (véase figura 7-21). Como se discute en la sección 2.10, la presencia de segmentos compartidos entre diversas proteínas sugiere forzosamente que muchos genes actuales han surgido durante la evolución por la fusión de partes de ancestrales genes separados. En la fibronectina, los aproximadamente 30 dominios Fn se combinan para formar cinco o seis unidades funcionales más grandes, ilustradas por los cilindros coloreados en la figura 7-10*a*). Cada una de las dos cadenas polipeptídicas que componen una molécula de fibronectina contiene:

Sitios de unión para numerosos componentes de la ECM, como colágenos, proteoglucanos y otras moléculas de fibronectina. Estos sitios de unión facilitan las interacciones que unen estas diversas moléculas en una red estable e interconectada (véase figura 7-5). Las actividades de unión de las moléculas de fibronectina se potencian por fuerzas mecánicas que ejercen presión sobre estas proteínas fibrosas y despliegan sus módulos componentes. El despliegue de estos módulos expone sitios de unión que de otro modo habrían permanecido enterrados.

Sitios de unión para receptores en la superficie de la célula. Estos sitios de unión mantienen a la ECM en una conexión estable a la célula (véase figura 7-5). La importancia de un sustrato que contiene fibronectina para la unión celular se ilustra en la figura 7-10*f*). La célula endotelial cultivada que se muestra en esta foto ha adoptado una forma diferente a cualquiera que tendría en el cuerpo porque se ha extendido sobre la superficie disponible proporcionada por una cubierta cuadrada de fibronectina.

La importancia de la fibronectina y otras proteínas extracelulares es particularmente evidente durante el desarrollo embrionario. El desarrollo se caracteriza por ondas de migración celular durante las cuales diferentes células siguen rutas distintas de una parte del embrión a otra (véase **FIGURA 7-11*a***). Las células migratorias están guiadas por proteínas, como la fibronectina, que están contenidas dentro del paisaje molecular por el que pasan. Por ejemplo, las células de la cresta neural, que migran desde el sistema nervioso en desarrollo a prácticamente todas las partes del embrión, atraviesan las vías ricas en fibrillas compuestas de moléculas de fibronectina interconectadas (véase figura 7-10*b*). La capacidad de estas vías de fibronectina para dirigir la migración de células de la cresta neural se puede recapitular en una placa de cultivo, como se muestra en la figura 7-10*c*). Varios órganos del cuerpo, incluyendo la glándula salival, el riñón y el pulmón, se forman mediante un proceso de ramificación en el cual la capa epitelial se divide por una serie de hendiduras (consúltese figura 7-10*d*). La importancia de la fibronectina en la formación de estas hendiduras se ilustra en la figura 7-10*e*), que muestra una glándula salival que se ha incubado con anticuerpos que se unen a la fibronectina. La formación y ramificación de hendiduras está completamente abolida como resultado de la inactivación de las moléculas de fibronectina.

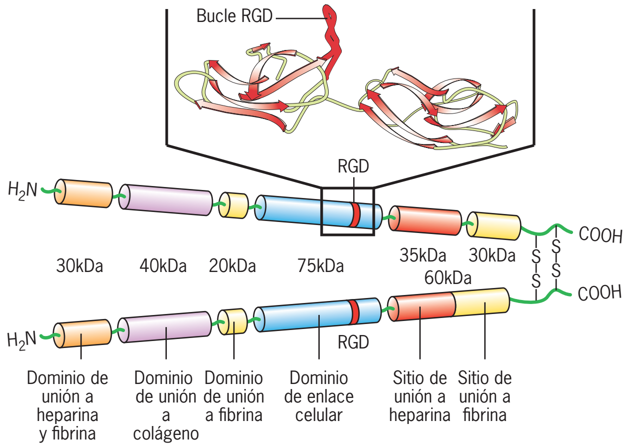
## Laminina

Las *lamininas* son una familia de glucoproteínas extracelulares que constan de tres cadenas polipeptídicas diferentes unidas por enlaces disulfuro y organizadas en una molécula que se asemeja a una cruz con tres brazos cortos y un brazo largo (consúltese figura 7-5). Se han identificado al menos 15 lamininas diferentes. Al igual que la fibronectina, las lamininas extracelulares pueden influir en gran medida en el potencial de migración, crecimiento y diferenciación de una célula. Por ejemplo, las lamininas desempeñan una función crítica en la migración de las células germinales primordiales (consúltese figura 7-11*a*). Estas células surgen en el saco vitelino, que se encuentra fuera del embrión, y luego migran a través del torrente sanguíneo y los tejidos embrionarios a la gónada en desarrollo, donde finalmente dan lugar a la esperma o los huevos. Durante su migración, las células germinales primordiales atraviesan superficies que son particularmente ricas en laminina (véase figura 7-11*b*). Las células germinales primordiales poseen una proteína de superficie celular que se adhiere fuertemente a una de las subunidades de la molécula de laminina. La influencia de la laminina sobre la excrecencia del nervio se muestra en la figura 9-48*a*).

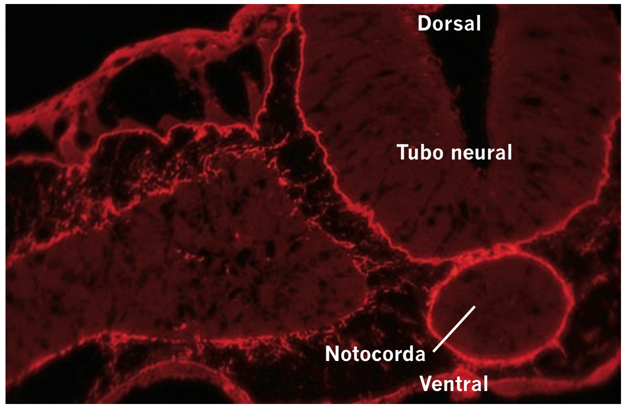
Además de unirse estrechamente a los receptores de la superficie celular, las lamininas se pueden unir a otras moléculas de laminina, a proteoglucanos y a otros componentes de las membranas basales (consúltese figura 7-5). Se cree que la laminina y las moléculas de colágeno tipo IV de las membranas basales forman redes separadas, pero interconectadas, como se representa en la **FIGURA 7-12**. Estas redes entrelazadas dan a las membranas basales tanto resistencia como flexibilidad. De hecho, las membranas basales no se forman en los embriones de ratón que no pueden sintetizar laminina, lo que causa la muerte del embrión en el momento de la implantación.

### REPASO

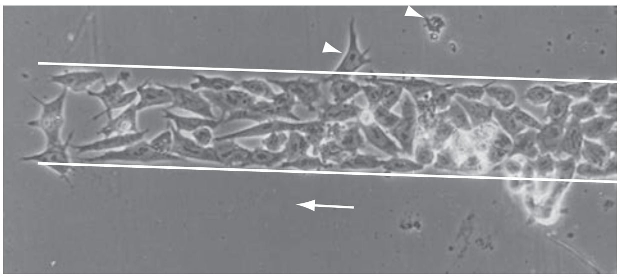
1. Compare los roles del colágeno y los proteoglucanos en el espacio extracelular. ¿Cómo contribuyen la fibronectina y la laminina al desarrollo embrionario?
2. Enumere algunas de las funciones de la matriz extracelular en tejidos animales.



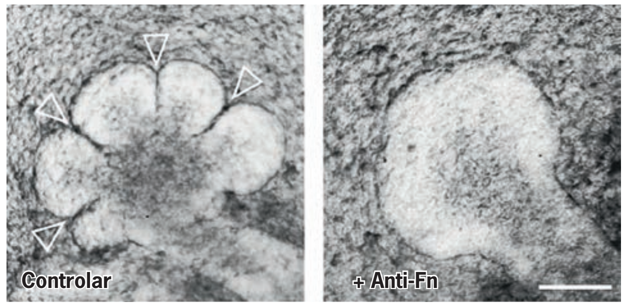

a)



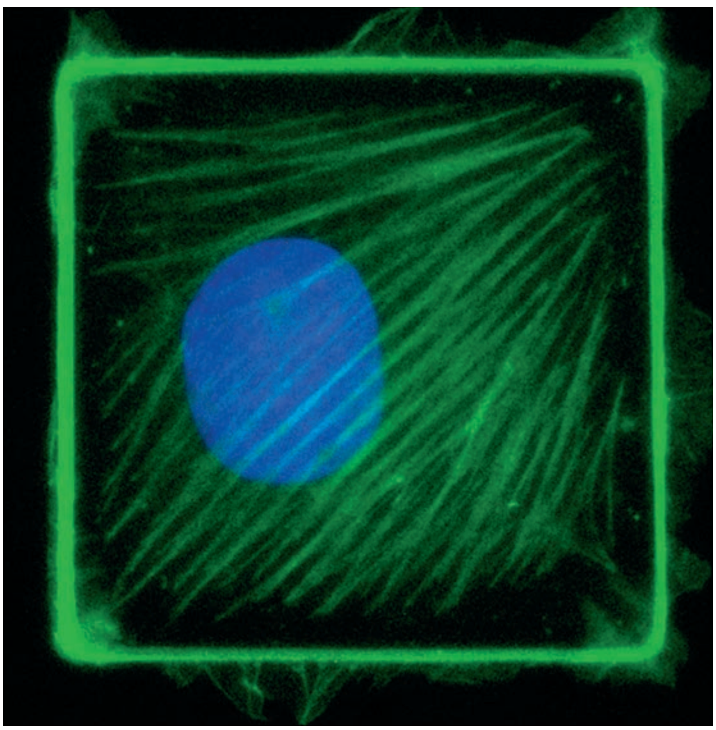

b)



c)




d) e)



f)

**FIGURA 7-10 Estructura de la fibronectina y su importancia durante el desarrollo embrionario.** *a*) Una molécula de fibronectina humana consiste en dos polipéptidos similares, pero no idénticos, unidos por un par de enlaces disulfuro localizados cerca de los extremos C-terminales. Cada polipéptido se compone de una serie lineal de módulos distintos, que se organizan en varias unidades funcionales más grandes, ilustradas por los cilindros de colores en esta figura. Cada una de estas unidades funcionales contiene uno o más sitios de unión para un componente específico de la ECM o para la superficie de las células. Las etiquetas idican algunas de estas actividades de unión. Se indica el sitio de unión celular del polipéptido que contiene la secuencia arg-gli-asp, o RGD. Como se discute más adelante en este capítulo, esta secuencia se une específicamente a una clase particular de proteínas integrales de la membrana plasmática (integrinas) que están involucradas en la unión celular y la transducción de señales. El recuadro muestra dos de los aproximadamente 30 módulos de Fn repetitivos que comprenden el polipéptido; la secuencia RGD forma un bucle del polipéptido, que sobresale de un módulo. *b*) Una sección a través de un embrión de pollo de poco tiempo que ha sido tratado con anticuerpos fluorescentes contra la fibronectina. La fibronectina está presente como fibrillas en las membranas basales (sitios rojo oscuro) que se encuentran debajo del epitelio embrionario y proporcionan un sustrato sobre el cual migran las células. *c*) En esta micrografía, las células de la cresta neural están migrando desde una porción del sistema nervioso del pollo en desarrollo (más allá del borde de la foto) a una placa de cultivo de vidrio, que contiene tiras de superficie recubierta de fibronectina que alternan con tiras de vidrio desnudo. El límite de una región recubierta de fibronectina está indicado por las líneas blancas. Es evidente que las células permanecen exclusivamente en la superficie recubierta de fibronectina. Las células que alcanzan el sustrato de vidrio (puntas de flecha) tienden a redondearse y perder sus capacidades migratorias. La flecha indica la dirección de la migración. *d, e*) La función de la fibronectina en la formación de la glándula salival embrionaria. La micrografía en *d*) muestra una glándula salival embrionaria de ratón que se ha cultivado durante 10 horas. Se observa que la glándula se divide en yemas separadas por una serie de hendiduras (triángulos abiertos). La glándula mostrada en *e*) se ha cultivado durante el mismo periodo en presencia de un anticuerpo antifibronectina, que ha inhibido completamente la formación de hendiduras. La barra de escala es igual a 100 µm. *f*) Microfotografía de fluorescencia de una célula endotelial —un tipo de célula que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos—. La célula es cuadrada porque se ha diseminado sobre un pequeño parche cuadrado de una proteína adhesiva llamada fibronectina que se aplicó a una placa de cultivo. La célula parece estar montada en un marco verde porque se trató con un anticuerpo fluorescente verde que se une a la proteína citoplásmica actina, un componente del citoesqueleto.

FUENTE: *b*) Cortesía de James W. Lash; *c*) de Giovanni Levi, Jean-Loup Duband y Jean Paul Thiery. *Int Rev Cytol* 1990;123:213. © 1990, con permiso de Elsevier; *d-e*) de Takayoshi Sakai, Melinda Larsen y Kenneth M. Yamada. *Nature* 2003;423:877, figs. 3a y 3b © 2003, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.; *f*) de Christopher S. Chen, Clifford Brangwynne y Donald E. Ingber. *Trends Cell Biol* 1999;9:283; © 1999, con permiso de Elsevier.

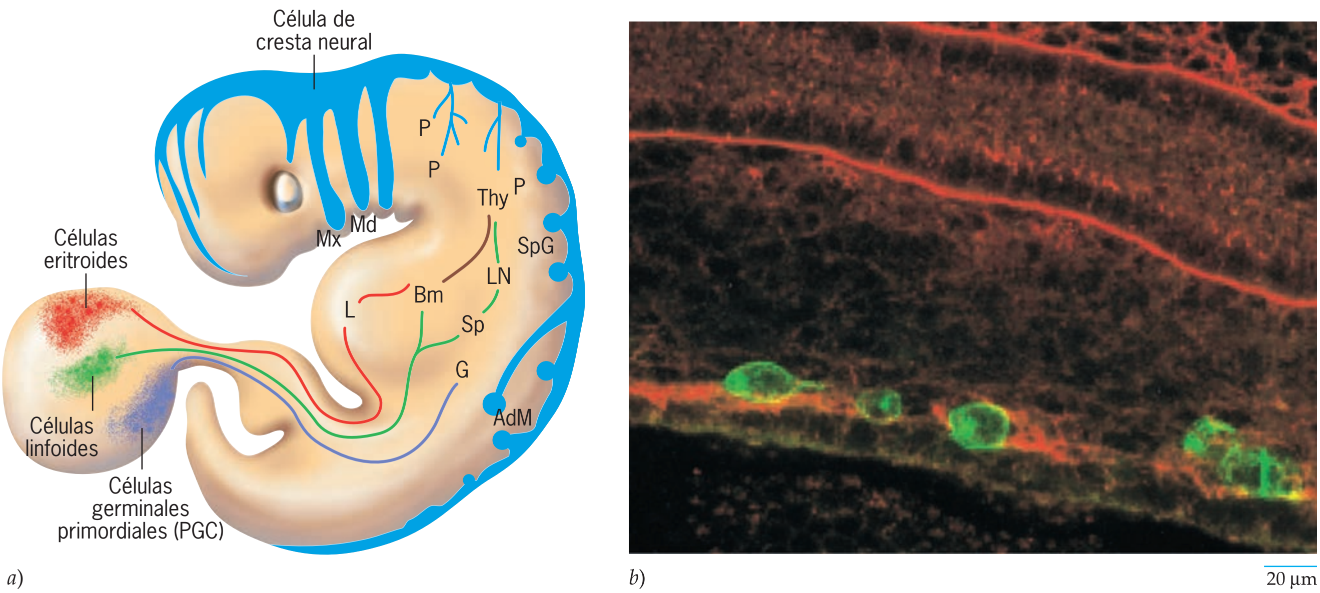



**FIGURA 7-11** Función de la migración celular durante el desarrollo embrionario. *a*) Un resumen de parte del tráfico celular que ocurre durante el desarrollo de mamíferos. Las células de la cresta neural (mostradas en azul) conducen los movimientos más extensos, en migraciones desde la placa neural en la línea media dorsal del embrión que dan lugar a todas las células de los ganglios simpáticos de la piel (P, *pigment*), los ganglios simpáticos (SpG, *sympathetic ganglia*), médula suprarrenal (AdM, *adrenal medulla*) y el cartílago del cráneo embrionario (Mx, Md para arcos maxilares y mandibulares). Las células germinales primordiales (PGC, *primordial germ cells*) migran desde el saco vitelino al sitio de formación de la gónada (G, *gonad*) dentro del embrión. Los progenitores de las células linfoides se transportan al hígado (L, *liver*), a la médula ósea (Bm, *bone marrow*), al timo (Thy, *thymus*), a los ganglios linfáticos (LN, *lymp nodes*) y al bazo (Sp, *spleen*). (*Nota:* Las "vías" que se muestran aquí conectan los sitios originales de las células con sus destinos, no representan con precisión las vías reales de las células). *b*) Micrografía de una sección de una porción del intestino posterior de un embrión de ratón de 10 días. Se observa que las células germinales primordiales (verde) migran a lo largo del mesenterio dorsal en su camino hacia la gónada en desarrollo. El tejido se ha teñido con anticuerpos contra la proteína laminina (roja), que se observa que está concentrada en la superficie sobre la que están migrando las células.

FUENTE: *a*) A. A. Moscona y R. E. Hausman, *Cell and Tissue Interactions*. J. W. Lash y M. M. Burger (eds.). Raven Press; 1977 ISBN: 0890041806; *b*) de Martin I. Garcia-Castro, Robert Anderson, Janet Heasman, *et al*. *J Cell Biol* 1997;138:475, fig. 3. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

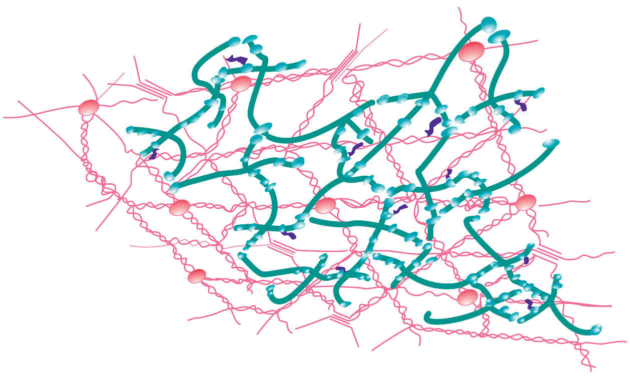


**FIGURA 7-12 Modelo del esqueleto de la membrana basal.** Las membranas basales contienen dos moléculas formadoras de redes, colágeno IV (rosa), que se ilustra en la figura 7-8, y laminina (verde), que se indica por las moléculas engrosadas en forma de cruz. Las redes de colágeno y laminina están conectadas por moléculas de entactina (púrpura).

FUENTE: Copyright 1992; Rockefeller University Press. Originalmente publicada en *The Journal of Cell Biology* 117:1132.

## 7.4 Propiedades dinámicas de la matriz extracelular

Las micrografías y diagramas presentados en la primera sección de este capítulo describen la matriz extracelular (ECM) como una estructura estática. En realidad, la ECM puede exhibir propiedades dinámicas, tanto en espacio como en tiempo. Espacialmente, por ejemplo, se puede ver que las fibrillas de la ECM se estiran varias veces más de lo normal a medida que las células las empujan y se contraen cuando se alivia la tensión. Temporalmente, los componentes de una ECM están sujetos a degradación y reconstrucción continuas. Estos procesos sirven para renovar la matriz y permitir su remodelación durante el desarrollo embrionario o después de una lesión tisular. Incluso la matriz calcificada de nuestros huesos, que consideramos una estructura estable e inerte, está sujeta a una restauración continua.

La degradación de los materiales extracelulares, junto con las proteínas de la superficie celular, se logra en gran parte por una familia de enzimas que contienen zinc llamadas **metaloproteinasas de la matriz** (**MMP**, *matrix metalloproteinases*) que se secretan al espacio extracelular o se anclan a la membrana plasmática. Como grupo, las MMP pueden digerir casi todos los diversos componentes de la ECM, aunque los miembros de la familia están limitados en cuanto a los tipos de moléculas extracelulares que pueden atacar. Las funciones fisiológicas de las MMP no se conocen bien, pero se cree que están involucradas en la remodelación tisular, la migración de células embrionarias, la cicatrización de heridas y la formación de vasos sanguíneos. Como podría esperarse de las enzimas cuya función normal es destruir materiales extracelulares, la actividad excesiva o inapropiada de las MMP es probable que cause enfermedad. De hecho, las MMP se han implicado en una serie de afecciones patológicas, que incluyen artritis, enfermedad de las encías y los dientes, formación de coágulos sanguíneos e infarto cardiaco, y progresión tumoral (sección 7.8). Al menos tres trastornos esqueléticos hereditarios se han rastreado a mutaciones en genes MMP.

## 7.5 Integrinas

Se observó en la discusión anterior que los componentes de la ECM, como la fibronectina, laminina, proteoglucanos y colágeno, son capaces de unirse a los receptores situados en la superficie de la célula (como en la figura 7-5). La familia más importante de receptores que unen células a su microambiente extracelular es la de las integrinas.

Las **integrinas** son una familia de proteínas de membrana que se encuentran solo en animales y desempeñan una función clave en la integración de los entornos extracelular e intracelular. En el lado externo de la membrana plasmática, las integrinas se unen a un conjunto notablemente diverso de moléculas (ligandos) presentes en el entorno extracelular. En el lado intracelular de la membrana, las integrinas interactúan directa o indirectamente con docenas de proteínas diferentes para influir en el curso de los eventos dentro de la célula. Las integrinas están compuestas por dos cadenas de polipéptidos que se unen a las membranas, una cadena α y una cadena β, que están unidas de manera no covalente. Se han identificado 18 subunidades α y ocho subunidades β diferentes. Aunque teóricamente podrían aparecer más de 100 posibles emparejamientos de subunidades α y β, solo se han identificado unas dos docenas de integrinas diferentes en las superficies de las células, cada una con una distribución específica dentro del cuerpo. Mientras que muchas subunidades se hallan en un solo heterodímero de integrina, la subunidad $\beta_1$ se encuentra en 12 integrinas diferentes y la subunidad $\alpha_v$ en cinco de ellas (véase tabla 7-1). La mayoría de las células poseen una variedad de integrinas diferente, y por el contrario, la mayoría de las integrinas están presentes en una variedad de diferentes tipos de células.

Las observaciones en el microscopio electrónico de moléculas de integrina, que comenzaron a fines de la década de 1980, sugirieron que las dos subunidades están orientadas para formar una cabeza extracelular globular conectada a la membrana por un par de "piernas" alargadas (como se muestra en la figura 7-5). Las piernas de cada subunidad se extienden a través de la bicapa lipídica como una sola hélice transmembrana y terminan en un pequeño dominio citoplasmático de aproximadamente 20 a 70 aminoácidos.[1] La primera estructura cristalográfica de rayos X de la porción extracelular de una integrina se publicó en 2001 y mostró una característica altamente inesperada. En lugar de "estar de pie" como se predijo, la integrina $\alpha_v\beta_3$ se dobló de manera drástica por las "rodillas" de modo que la cabeza mira hacia la superficie exterior de la membrana plasmática (véase figura 7-13). Para comprender el significado de esta estructura doblada, se necesita explorar las propiedades de las integrinas.

Un cuerpo de evidencia sugiere de manera contundente que la conformación doblada de la integrina que se muestra en la figura 7-13*a*) corresponde al estado inactivo de la proteína, que es incapaz de unirse a un ligando. De hecho, cuando se analiza una integrina $\alpha_v\beta_3$ que contiene un ligando unido, la integrina ya no exhibe la estructura doblada, sino que en su lugar está presente en una conformación vertical como se ilustra en la figura 7-13*b-c*). El ligando se une a la cabeza de la integrina en una hendidura donde se unen las subunidades α y β. Si las estructuras dobladas y verticales representan los estados inactivo y activo de una integrina, respectivamente, entonces es importante considerar qué tipo de estímulo es capaz de desencadenar una transformación tan notable en la conformación proteica.

En la conformación doblada e inactiva, los dominios transmembrana de las dos subunidades están muy próximos, aparentemente se mantienen juntos por interacciones no covalentes entre los residuos de las dos hélices. Los dominios citoplásmicos de las

[1] Una excepción a esta arquitectura molecular es la cadena $\beta_4$, que tiene miles de aminoácidos adicionales como parte de su dominio citoplásmico. Esta gran adición hace que las integrinas $\beta_4$ sean capaces de extenderse mucho más profundamente en el citoplasma (véase figura 7-19).

**TABLA 7-1 Clasificación de los receptores de la integrina basados en el reconocimiento de secuencias RGD**

| Reconocimiento RGD | | Reconocimiento no RGD | |
|---|---|---|---|
| **Receptor de integrina** | **Ligandos clave** | **Receptor de integrina** | **Ligandos clave** |
| $\alpha_3\beta_1$ | Fibronectina | $\alpha_1\beta_1$ | Colágeno |
| $\alpha_5\beta_1$ | Fibronectina | $\alpha_2\beta_1$ | Colágeno |
| $\alpha_v\beta_1$ | Fibronectina | | Laminina |
| | | $\alpha_3\beta_1$ | Colágeno |
| $\alpha_{IIb}\beta_3$ | Fibronectina | | Laminina |
| | Factor Von Willebrand | $\alpha_4\beta_1$ | Fibronectina |
| | Vitronectina | | VCAM |
| | Fibrinógeno | $\alpha_6\beta_1$ | Laminina |
| $\alpha_v\beta_3$ | Fibronectina | $\alpha_L\beta_2$ | ICAM-1 |
| | Factor Von Willebrand | | ICAM-2 |
| | Vitronectina | $\alpha_M\beta_2$ | Fibrinógeno |
| $\alpha_v\beta_5$ | Vitronectina | | ICAM-1 |
| $\alpha_v\beta_6$ | Fibronectina | | |

*Fuente:* S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plough. *Trends Biochemical Sciences* 1991;16:249. Trends in Biochemical Sciences by International Union of Biochemistry. Reproducido con permiso de la Unión Internacional de Bioquímica; Elsevier Publ. en formato revista vía Copyright Clearance Center.

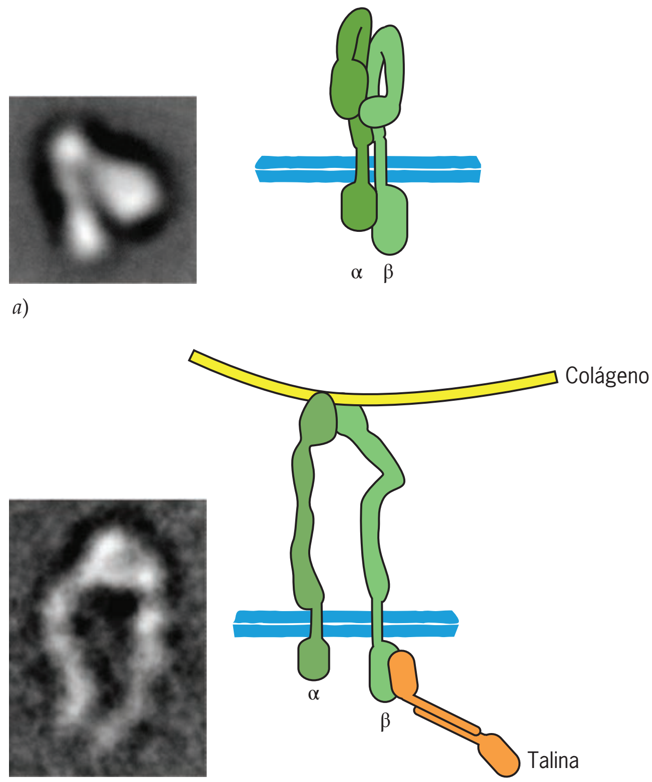



**FIGURA 7-13 Conformaciones de la integrina.** *a*) Dibujo esquemático de una integrina completa en la conformación doblada e inactiva, y una micrografía electrónica correspondiente de la porción extracelular de una molécula similar. *b*) Dibujo esquemático de una integrina en una conformación activa y unida a un ligando, en este caso talina. La unión de la talina al pequeño dominio citoplasmático de la subunidad β induce una separación de las dos subunidades y la conversión a la conformación activa. Las integrinas activadas por lo general se agrupan como resultado de las interacciones de sus dominios citoplásmicos con el citoesqueleto subyacente como se indica en la figura 7-16c). El ligando extracelular, en este caso una fibra de colágeno, se une a ambas subunidades en la región de la cabeza del dímero de integrina activada. Obsérvese que las conformaciones que son intermedias entre las que se muestran aquí también pueden existir y exhiben una unión a ligando disminuida.

FUENTE: Micrografías electrónicas de Junichi Takagi, *et al. Cell* 110:601, 2002; con el permiso de Elsevier; Diagrama Ribbon de TL Lau, *et al. Embo J* 2009;28:1359, fig. 9; cortesía de Tobias Ulmer; © 2009, reimpresa con permiso de Macmillan Publishers, Ltd.

integrinas se unen a una amplia gama de proteínas; una de estas proteínas, llamada talina, causa la separación de las subunidades α y β, como se muestra en la estructura de la integrina activa en la figura 7-13*b*). Las mutaciones en la talina que bloquean su interacción con las subunidades β de integrina también previenen la activación de las integrinas y la adhesión a la ECM. Se cree que la separación de las colas citoplásmicas y los dominios transmembrana de una integrina que resulta cuando se une la talina produce un cambio en la conformación a través de las piernas de la integrina, lo que hace que la molécula adopte una posición vertical en la que la cabeza de la proteína es capaz de interactuar específicamente con su ligando apropiado. Un aumento en la afinidad de las integrinas individuales a menudo se correlaciona con el agrupamiento de las integrinas activadas, lo que aumenta en gran medida la fuerza general de la interacción entre la superficie celular y sus ligandos extracelulares. Este tipo de alteración en la afinidad de integrina desencadenada por cambios que ocurren dentro de la célula se denomina señalización "de adentro hacia afuera".

Las integrinas han sido implicadas en dos tipos principales de actividades: la adhesión de las células a su sustrato (o a otras células) y la transmisión de señales entre el entorno externo y el interior de la célula. Ya hemos discutido la transmisión de señales en una dirección de dentro hacia fuera, que afecta principalmente a las propiedades de unión de las integrinas. La señalización también puede ocurrir en la dirección opuesta, un fenómeno conocido como señalización "de afuera hacia adentro". La unión del dominio extracelular de una integrina a un ligando, como la fibronectina o el colágeno, puede inducir un cambio conformacional en el extremo citoplasmático opuesto de la integrina, especialmente su subunidad β. Los cambios en el extremo citoplásmico pueden, a su vez, alterar la forma en que la integrina interactúa con un huésped de diferentes proteínas citoplásmicas y modificar su actividad. Por ejemplo, las señales de afuera hacia adentro pueden inducir un cambio conformacional en la talina en el interior de la membrana, lo cual inicia una cascada de eventos que conducen a la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto. La unión de integrinas a un ligando extracelular también puede desencadenar la activación de proteínas cinasas citoplásmicas, como FAK y Src (véase figura 7-16*c*). Estas cinasas pueden fosforilar otras proteínas, lo que inicia una reacción en cadena. En algunos casos, la reacción en cadena se dirige hacia el núcleo, donde se pueden activar un grupo específico de genes.

Las señales de afuera hacia adentro, transmitidas por las integrinas (y otras moléculas de la superficie celular) pueden influir en muchos aspectos del comportamiento celular, incluida la diferenciación, la motilidad, el crecimiento e incluso la supervivencia de la célula. La influencia de las integrinas en la supervivencia celular se ilustra mejor mediante la comparación de células normales y malignas. La mayoría de las células malignas son capaces de crecer mientras están suspendidas en un medio de cultivo líquido. Las células normales, en cambio, solo pueden crecer y dividirse si se cultivan en un sustrato sólido; si se colocan en cultivos en suspensión, mueren. Se cree que las células normales mueren en cultivos en suspensión porque sus integrinas no pueden interactuar con los sustratos extracelulares y, como resultado, no pueden transmitir señales salvadoras de vidas al interior de la célula. Cuando las células se vuelven malignas, su supervivencia ya no depende de la unión de integrinas. La función de las integrinas en la transmisión de señales es un área de investigación muy activa y se explorará más a fondo en la sección 7.10.

En la tabla 7-1 se detallan una serie de integrinas conocidas y los ligandos extracelulares clave a los que se unen. Debido a que las células individuales pueden expresar una variedad de integrinas diferentes en su superficie celular, tales células son capaces de unirse a una variedad de componentes extracelulares (véase figura 7-5). A pesar del aparente solapamiento visto en la tabla 7-1, la mayoría de las integrinas parecen tener funciones únicas, como sucede en ratones *knockout* (consúltese sección 18.17) que carecen de diferentes subunidades de integrina y presentan fenotipos diferentes. Por ejemplo, aquellos con bloqueos génicos de la $\alpha_8$ muestran defectos renales; de la $\alpha_4$, defectos cardiacos, y de la $\alpha_5$, defectos vasculares.

Muchas de las proteínas extracelulares que se unen a las integrinas lo hacen porque contienen la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (o, en la nomenclatura abreviada de aminoácidos, RGD). Este tripéptido está presente en los sitios de unión celular de proteoglucanos, fibronectina, laminina y otras proteínas extracelulares. El dominio de unión celular de la fibronectina, con su bucle extendido que contiene RGD, se muestra en la figura 7-10*a*).

El descubrimiento de la importancia de la secuencia RGD ha abierto la puerta a nuevas vías para el tratamiento de afecciones médicas que implican interacciones ligando-receptor. Cuando se daña la pared de un vaso sanguíneo, la región dañada se sella mediante la agregación controlada de plaquetas sanguíneas, que son fragmentos de células no nucleadas que circulan en la sangre. Cuando ocurre en un momento o lugar inapropiado, la agregación de plaquetas puede formar un coágulo de sangre potencialmente peligroso (*trombo*) que puede bloquear el flujo de sangre a los órganos principales y es una de las principales causas de infarto cardiaco y enfermedad cerebrovascular. La agregación de las plaquetas requiere la interacción de una integrina específica de plaquetas ($\alpha_{IIb}\beta_3$) con proteínas de la sangre que contienen RGD soluble, como fibrinógeno y factor de Von Willebrand, que actúan como enlazadores que mantienen juntas a las plaquetas (consúlte-

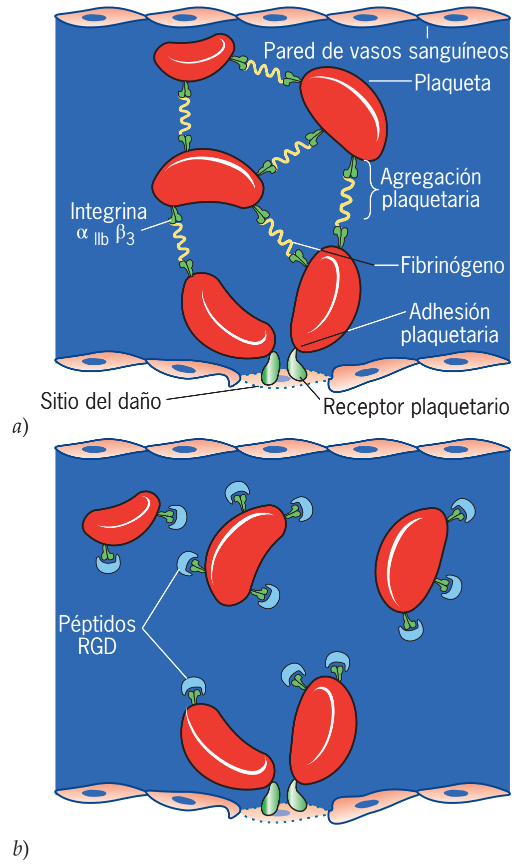



**FIGURA 7-14 Función de las integrinas en la agregación plaquetaria.** *a*) Los coágulos sanguíneos se forman cuando las plaquetas se adhieren entre sí a través de puentes de fibrinógenos que se unen a las integrinas plaquetarias. *b*) La presencia de péptidos RGD sintéticos puede inhibir la formación de coágulos sanguíneos mediante competición con las moléculas de fibrinógenos por los sitios de unión a RGD en las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ de las plaquetas. Los análogos no peptídicos de RGD y los anticuerpos antiintegrina pueden actuar de forma similar para evitar la formación de coágulos en los pacientes de alto riesgo.

se figura 7-14, arriba). Los experimentos con animales habían indicado que los péptidos que contienen RGD pueden inhibir la formación de coágulos sanguíneos al evitar que la integrina plaquetaria se una a las proteínas sanguíneas (véase figura 7-14, parte inferior). Estos hallazgos condujeron al diseño de una nueva clase de agentes antitrombóticos Aggrastat e Integrelin que se asemejan a la estructura RGD pero se unen selectivamente a la integrina plaquetaria. Ambas drogas se basan en las estructuras de los compuestos presentes en el veneno de serpiente. Un anticuerpo específico (ReoPro) dirigido contra el sitio de unión de RGD de las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ también puede evitar la formación de coágulos sanguíneos en ciertos pacientes sometidos a cirugías vasculares de alto riesgo. Se prescribe un anticuerpo diferente dirigido a integrinas (Tysabri) para el tratamiento de la esclerosis múltiple (véase "Perspectiva humana", capítulo 17).

Los dominios citoplásmicos de las integrinas contienen sitios de unión para una variedad de proteínas citoplásmicas, incluidas varias que actúan como adaptadores que unen la integrina a los filamentos de actina del citoesqueleto (véase figura 7-16). La función de las integrinas para establecer la conexión entre la ECM y el citoesqueleto se observa mejor en dos estructuras especializadas: adhesiones focales y hemidesmosomas.



**REPASO**

1. ¿Cómo pueden las integrinas unir la superficie celular con los materiales que componen la ECM? ¿Cómo difieren estructural y funcionalmente las estructuras activas e inactivas de las integrinas? ¿Cuál es el significado de la presencia de un diseño RGD en un ligando de integrina?
2. ¿Cómo se puede involucrar una proteína de la superficie celular tanto en la adhesión celular como en la transducción de señal transmembrana?
3. ¿Cuál es la diferencia entre la señalización interna y externa? ¿Cuál es la importancia de cada una para las actividades de la célula?

## 7.6 Anclaje de células a su sustrato

Es mucho más fácil estudiar la interacción de las células en el fondo de un plato de cultivo que en la matriz extracelular dentro de un animal. En consecuencia, gran parte de nuestro conocimiento de las interacciones célula-matriz se ha obtenido a partir del estudio de células que se adhieren a diversos sustratos *in vitro*. Las etapas en la unión de una célula cultivada a su sustrato se muestran en la **FIGURA 7-15**. Al principio, la célula tiene una morfología redondeada, como generalmente ocurre con las células animales suspendidas en medio acuoso. Una vez que la célula hace contacto con el sustrato, envía proyecciones que forman uniones cada vez más estables. Con el tiempo, la célula se aplana y se extiende sobre el sustrato.

### Adhesiones focales

Cuando los fibroblastos o las células epiteliales se extienden en el fondo de una placa de cultivo, la superficie inferior de la célula no se presiona uniformemente contra el sustrato. En cambio, la célula está anclada a la superficie del plato solo en sitios dispersos y discretos, llamados **adhesiones focales** (véase **FIGURA 7-16**). Las adhesiones focales son estructuras dinámicas que pueden desmontarse rápidamente si la célula adherente se estimula para moverse o entrar en mitosis. La membrana plasmática de una adhesión focal contiene grandes grupos de integrinas. Los dominios citoplásmicos de las integrinas están conectados a los filamentos de actina del citoesqueleto a través de capas estratificadas de proteínas adaptadoras (p. ej., talina, actinina y vinculina) (consúltese figura 7-16*c*). Las adhesiones focales desempeñan una función clave en la locomoción celular, durante la cual las integrinas desarrollan interacciones transitorias con los materiales extracelulares (véase figura 9-65*b*).

Las adhesiones focales son capaces de crear fuerzas mecánicas o responder a tales fuerzas. Estas propiedades pueden esperarse de una estructura que contiene actina y miosina, dos de las principales proteínas contráctiles de la célula. La **FIGURA 7-17**

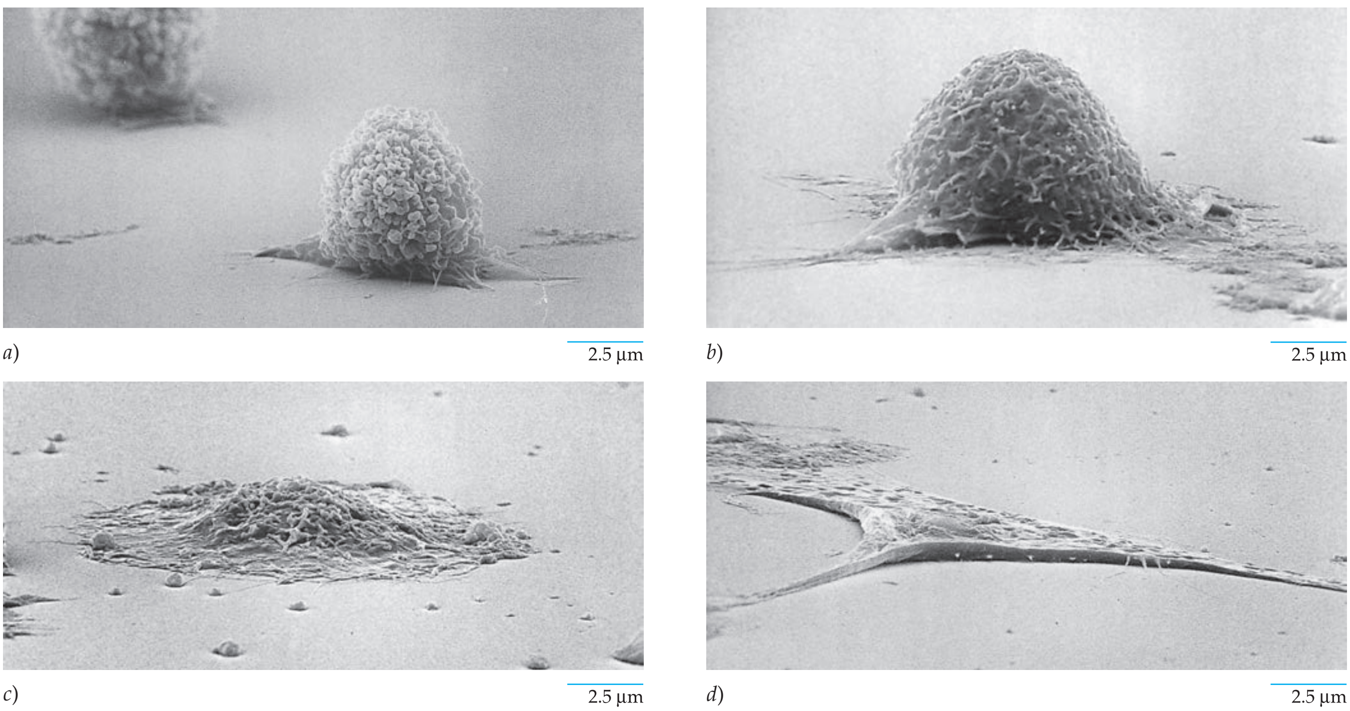
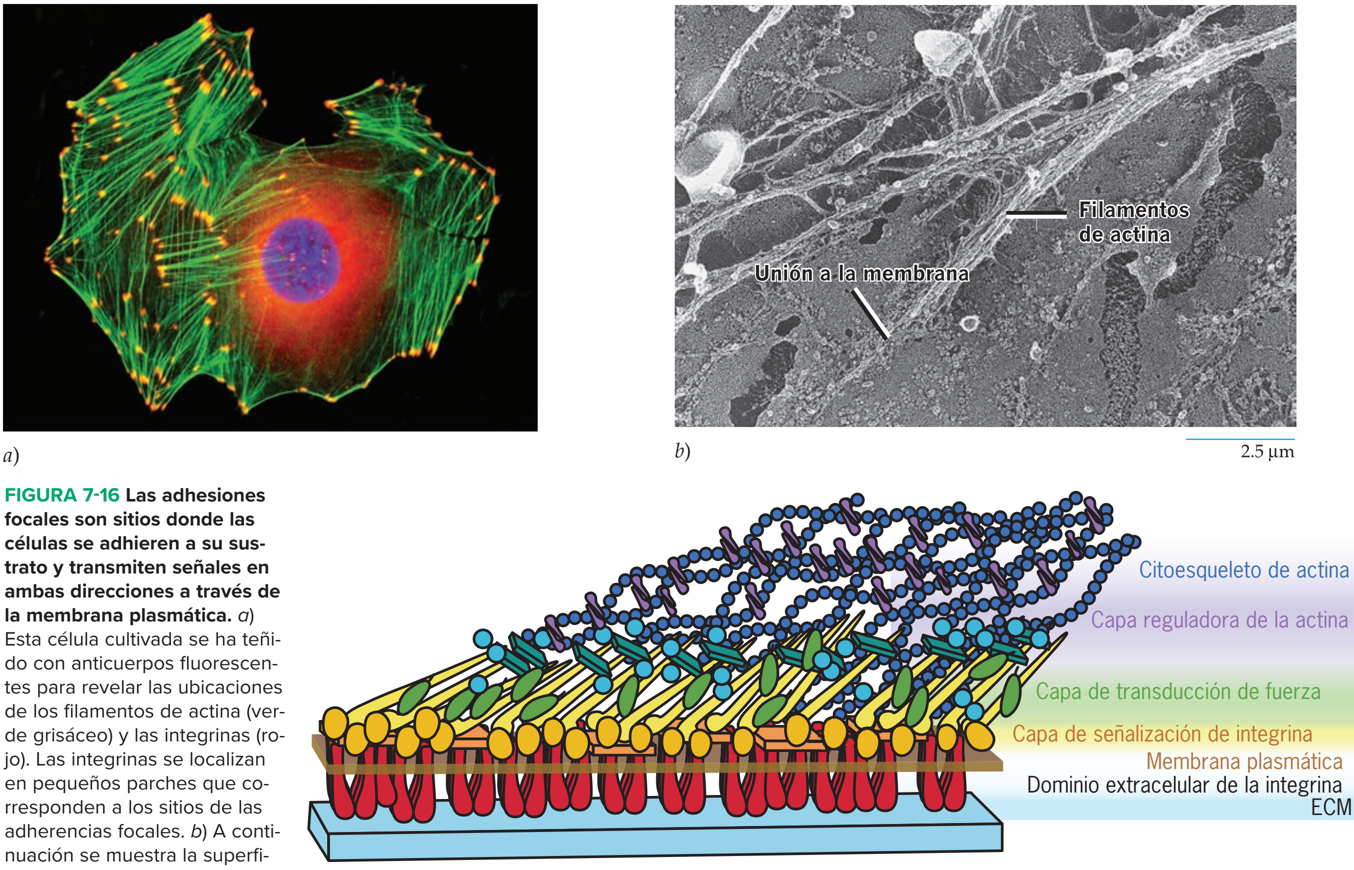



**FIGURA 7-15 Pasos en el proceso de propagación celular.** Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de los fibroblastos de ratón en sucesivas ocasiones durante la fijación y la propagación en cubreobjetos de vidrio. Las células fijadas después de *a*) 30 minutos, *b*) 60 minutos, *c*) 2 horas y *d*) 24 horas de unión.

FUENTE: *a-d*) de J. J. Rosen y L. A. Culp, *Exp Cell Res* 1977;107:141, con permiso de Elsevier.




*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 7-16 Las adhesiones focales son sitios donde las células se adhieren a su sustrato y transmiten señales en ambas direcciones a través de la membrana plasmática.** *a*) Esta célula cultivada se ha teñido con anticuerpos fluorescentes para revelar las ubicaciones de los filamentos de actina (verde grisáceo) y las integrinas (rojo). Las integrinas se localizan en pequeños parches que corresponden a los sitios de las adherencias focales. *b*) A continuación se muestra la superficie citoplasmática de una adhesión focal de una célula de anfibio cultivada. La superficie interna de la membrana se procesó para un análisis de congelación rápida y profundización. Los haces de filamentos de actina se asocian con la superficie interna de la membrana en la región de una adhesión focal. *c*) Dibujo esquemático de una adhesión focal que muestra las interacciones de las moléculas de integrina con otras proteínas en ambos lados de la bicapa lipídica. Se cree que la unión de los ligandos extracelulares, como el colágeno y la fibronectina, induce cambios conformacionales en los dominios citoplásmicos de las integrinas que hacen que las integrinas (rojo) se vinculen a los filamentos de actina del citoesqueleto. Los enlaces con el citoesqueleto conducen, a su vez, al agrupamiento de integrinas en la superficie celular. Los enlaces con el citoesqueleto están mediados por varias proteínas de unión a la actina, como la talina (que se muestra en amarillo) y la α-actinina (púrpura), que se unen a la subunidad β de la integrina. Durante el proceso de formación de adhesión focal, la talina experimenta un cambio conformacional que expone los sitios de unión en el dominio de la varilla de talina. La unión de la vinculina (verde claro) a estos sitios expuestos promueve el ensamblaje de filamentos de actina adicionales. Los dominios citoplásmicos de las integrinas también están asociados con las proteínas cinasas, como la FAK (*focal adhesion kinase*) (cinasa de adhesión focal, que se muestra en naranja) y Src. La unión de la integrina a un ligando extracelular puede activar estas proteínas cinasas y comenzar una reacción en cadena que transmite señales a través de la célula. La asociación de las moléculas de miosina con los filamentos de actina puede generar fuerzas de tracción que se transmiten a los sitios de unión célula-sustrato.

FUENTE: *a*) De Molecular expressions.com de Florida State University; *b*) de Steven J. Samuelsson, Paul J. Luther, David W. Pumplin, *et al. J Cell Biol* 1993;122:487; fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press. *c*): de P. Kanchanawong, *et al*. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd. *Nature* 2010;468:580-584.

muestra un fibroblasto que yace sobre un lecho de columnas revestidas de fibronectina. Las columnas son flexibles y pueden moverse independientemente entre sí. Se puede ver en esta micrografía que las puntas de las columnas se están desviando como resultado de las fuerzas de tracción ejercidas por las adhesiones focales de la célula.

Actuando en la dirección opuesta, las fuerzas mecánicas aplicadas a las superficies de las células se pueden convertir por las adhesiones focales en señales bioquímicas en el citoplasma. Este proceso de conversión de señal se describe como *mecanotransducción*, y la adhesión focal actúa como un *mecanosensor* al reconocer las propiedades físicas del entorno. La capacidad de las células para responder a las fuerzas físicas es importante en muchos comportamientos celulares y se puede ilustrar mediante un estudio en el que se permitió que las células se unieran a cuentas que se habían recubierto de fibronectina. Cuando las cuentas unidas a la membrana se estiraron con una pinza óptica (consúltese p. 135), el estímulo mecánico se transmitió al interior de la célula donde generó una onda de activación de la Src cinasa. Se midió que la fuerza de un enlace integrina-ligando era del orden de los 40 piconewtons (Pn, *piconewtons*), con base en un experimento en el que se inmovilizó un ligando de integrina en una superficie usando diferentes cadenas moleculares que se rompen a diferentes fuerzas. Como se muestra en la **FIGURA 7-18**, una fuerza de 56 pN permitió a la célula formar fuertes adherencias focales y fibras de tensión de actina, mientras que una fuerza de 43 pN no lo hizo. Se cree que la mecanotransducción está mediada por cambios conformacionales en algunas de las proteínas adaptadoras, como la talina, que son inducidos por el estiramiento. Dichos cambios conformacionales pueden exponer sitios de unión importantes en estas proteínas que estaban previamente ocultos, lo que permite el reclutamiento de moléculas de proteína adicionales en el complejo de adhesión.

En la figura 7-16*c*) se ilustra cómo la atracción de una molécula de fibronectina o colágeno puede activar proteínas cinasas, como FAK o Src, que luego podrían fosforilar varios sustratos. La activación de estas proteínas cinasas puede transmitir señales a través de la célula, incluido el núcleo celular, donde pueden promover cambios en la expresión génica. La activación de FAK o Src puede alterar drásticamente el comportamiento de las células. La

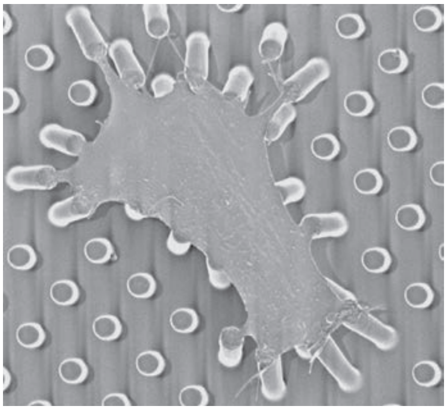


**FIGURA 7-17 Demostración experimental de las fuerzas que se ejercen por las adhesiones focales.** Micrografía electrónica de barrido de una célula del músculo liso que se encuentra sobre un lecho de microcolumnas flexibles (elastoméricas) cuyas puntas se han recubierto con fibronectina. Se observa la célula adjunta que desvía la posición de varias columnas. El grado de movimiento de una columna en particular refleja la magnitud de las fuerzas de tracción ejercidas por la célula en esa columna.

FUENTE: De John L. Tan, *et al. PNAS* 2003;100:1484, fig. 2d, cortesía de Christopher S. Chen. © 2003 National Academy of Sciences, U.S.A.

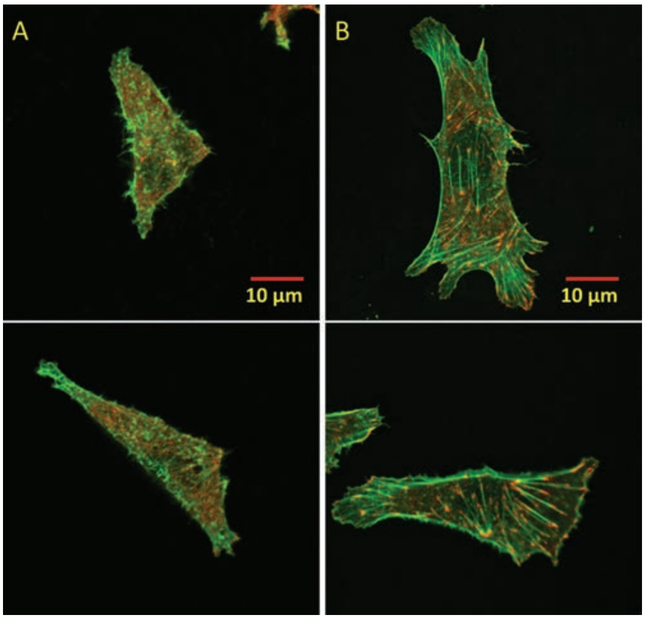



**FIGURA 7-18 Medición de la fuerza necesaria para activar las integrinas.** En este experimento, un ligando de integrina se une a un sustrato de vidrio mediante una correa que se romperá una vez que se aplique una fuerza específica. Se permite que las células de mamíferos se extiendan sobre el vidrio, y se tiñen por la actina (verde) y un marcador de adhesión focal (la vinculina, en rojo). Cuando se usaron fuerzas para una resistencia de ruptura de 43 piconewtons, las integrinas no se activaron y no se formaron adhesiones focales. Sin embargo, las fuerzas para una resistencia de ruptura de 56 piconewtons dieron como resultado la activación de la integrina, como se observa, a través de la formación de las adhesiones focales (derecha).

FUENTE: De Wang, *et al. Science* 2013 mayo 24;340(6135):991-4. doi: 10.1126/science.1231041.

importancia de las propiedades físicas del entorno de una célula para influir en el comportamiento celular, se ilustra mediante un estudio en el que las células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*) derivadas de la médula ósea adulta se cultivaron en sustratos de elasticidad (o rigidez) variable. Cuando estas MSC se cultivaron en un sustrato blando y flexible, como el que podría encontrarse una célula dentro del cerebro en desarrollo, las MSC se diferenciaron en células nerviosas. Cuando crecen en un sustrato de mayor rigidez, estas mismas células se diferencian en células musculares. Finalmente, cuando crecen en sustratos incluso más rígidos, como los que podrían albergar células que crecen en un tejido esquelético como el cartílago o el hueso, las MSC se diferencian en osteoblastos, que dan lugar a células óseas.

## Hemidesmosomas

Las adhesiones focales se observan con mayor frecuencia en células cultivadas *in vitro*, aunque se encuentran tipos similares de contactos adhesivos en ciertos tejidos, como el músculo y el tendón. Dentro del cuerpo, la unión más estrecha entre una célula y su matriz extracelular se observa en la superficie basal de las células epiteliales donde estas están ancladas a la membrana basal subyacente mediante una estructura adhesiva especializada llamada **hemidesmosoma** (consúltense figuras 7-1 y 7-19). Los he-

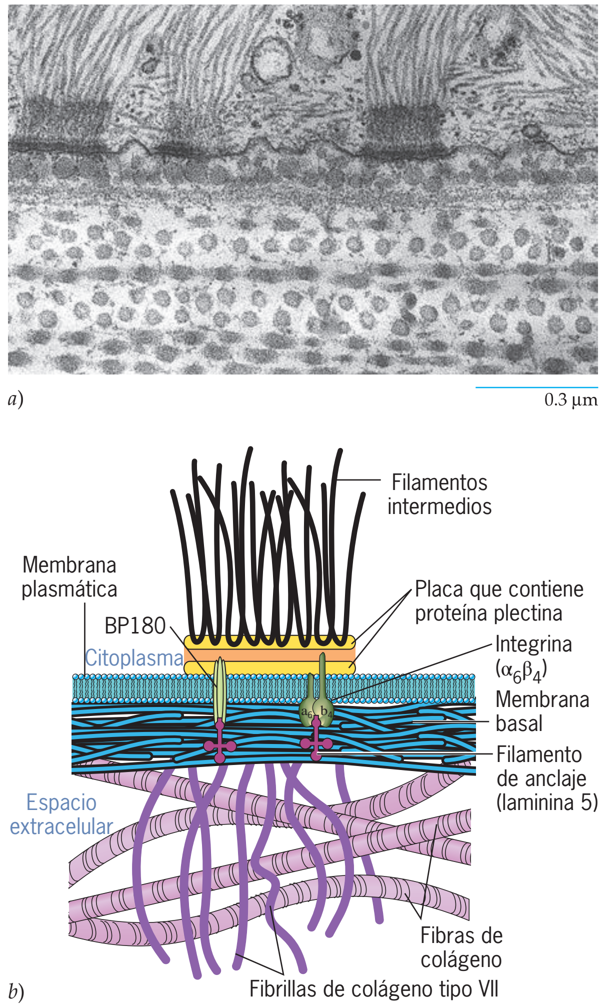



**FIGURA 7-19 Los hemidesmosomas son sitios diferenciados en las superficies basales de las células epiteliales donde las células están unidas a la membrana basal subyacente.** *a*) Micrografía electrónica de varios hemidesmosomas que muestra la placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática y los filamentos intermedios que se proyectan hacia el citoplasma. *b*) Diagrama esquemático que muestra los principales componentes de un hemidesmosoma que conecta la epidermis a la dermis subyacente. Las moléculas de integrina $\alpha_6\beta_4$ de las células epidérmicas están unidas a filamentos intermedios citoplásmicos por una proteína llamada plectina que está presente en la placa de tinción oscura y en la membrana basal mediante el anclaje de filamentos de un tipo particular de laminina. Una segunda proteína transmembrana (BP180) también está presente en los hemidesmosomas. Las fibras de colágeno son parte de la dermis subyacente.

FUENTE: *a*) De Douglas E. Kelly, *J. Cell Biol* 1966;28:51 (figura inferior), fig. 11. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

midesmosomas contienen una placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática con filamentos que salen hacia el citoplasma (véase **FIGURA 7-19*a***). A diferencia de los filamentos de las adhesiones focales, que consisten en actina, los filamentos del hemidesmosoma son más gruesos y se componen de la proteína queratina. Los filamentos que contienen queratina se clasifican como filamentos intermedios, que tienen principalmente una función de soporte (como se analiza en detalle en la sección 9.9). Los filamentos de queratina del hemidesmosoma están ligados a la matriz extracelular por membranas que se unen a integrinas, incluidas $\alpha_6\beta_4$ (véase figura 7-19*b*). Al igual que sus contrapartes en las adhesiones focales, estas integrinas también transmiten señales desde la ECM que afectan la forma y las actividades de las células epiteliales asociadas.

La importancia de los hemidesmosomas se revela por una enfermedad rara, el *penfigoide ampolloso*, en la cual los individuos producen anticuerpos que reconocen las proteínas presentes en estas estructuras adhesivas. Las enfermedades causadas por la producción de anticuerpos dirigidos contra los propios tejidos (es decir, autoanticuerpos) se denominan trastornos autoinmunes y son responsables de una amplia variedad de afecciones. En este caso, la presencia de autoanticuerpos hace que la capa inferior de la epidermis pierda adhesión a la membrana basal subyacente (y por tanto a la capa subyacente de tejido conectivo de la dermis). La fuga de líquido en el espacio debajo de la epidermis resulta en ampollas severas de la piel. Una enfermedad ampollosa hereditaria similar, la *epidermólisis bullosa*, puede ocurrir en pacientes con alteraciones genéticas en cualquiera de varias proteínas hemidesmosómicas, incluidas la subunidad de integrina $\alpha_6$ o $\beta_4$, el colágeno VII o la laminina 5.

**REPASO**

1. Enumere dos características que distinguen a los hemidesmosomas de las adhesiones focales.

## 7.7 Interacciones de las células con otras células

El examen de una sección delgada a través de un órgano principal de un animal revela una arquitectura compleja que implica una variedad de diferentes tipos de células. Poco se sabe sobre los mecanismos precisos responsables de generar los complejos arreglos celulares tridimensionales que se encuentran en los órganos en desarrollo. Se presume que este proceso depende en gran medida en las interacciones *selectivas* entre las células del mismo tipo, así como entre las células de tipo diferente. Es evidente que las células pueden reconocer las superficies de otras células, al interactuar con algunas e ignorar otras.

Los primeros intentos de aprender sobre el reconocimiento y la adhesión de las células se llevaron a cabo mediante la eliminación de un órgano en desarrollo de un embrión de pollo o anfibio, al disociar los tejidos del órgano para formar una suspensión de células individuales y determinar la capacidad de las células para reagruparse en el cultivo (véase **FIGURA 7-20*a***). En experimentos

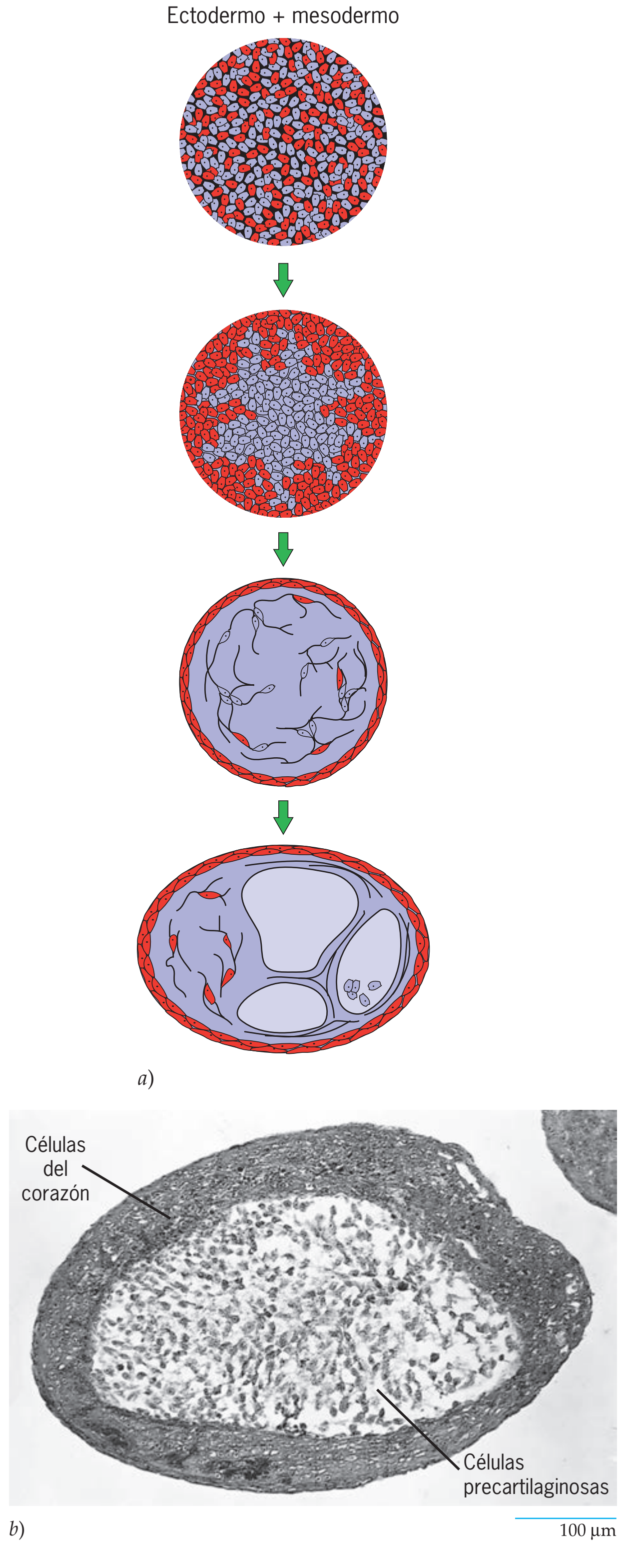



**FIGURA 7-20 Demostración experimental del reconocimiento célula-célula.** Cuando las células de diferentes partes de un embrión se disocian y luego se entremezclan, las células se agregan inicialmente y luego se separan mediante la asociación con otras células del mismo tipo. Se muestran aquí los resultados de dos experimentos clásicos de este tipo. *a*) En este experimento, dos regiones (ectodermo y mesodermo) de un embrión anfibio de poco tiempo se disociaron en células individuales y se combinaron. Al principio, las células forman un agregado mixto, pero finalmente se separan. Las células ectodérmicas (que se muestran en rojo) se mueven hacia la superficie externa del agregado, que es donde se ubicarían en el embrión, y las células mesodérmicas (que se muestran en color púrpura) se desplazan hacia el interior, la posición que ocuparían en el embrión. Ambos tipos de células se diferencian en los tipos de estructuras que normalmente generarían. *b*) Micrografía de luz que muestra los resultados de un experimento en el que las células precartilaginosas de una extremidad de pollo se mezclan con células del ventrículo del corazón de un pollo. Los dos tipos de células se han separado del agregado mixto con células del corazón y han formano una capa en el exterior de las células precartilaginosas. Se propone que las células precartilaginosas se acumulen en el centro del agregado porque las células se adhieren entre sí de manera más fuerte que las células del corazón. (Este y otros modelos se discuten en *Nat Cell Biol* 2008;10:375).

FUENTE: *a*) P. L. Townes, J. Holtfreter. *Journal of Experimental Zoology* 1955;128:53; *b*) M. S. Steinberg, *Journal Experimental Zoology* 1970;173-411. Este material se usa con el permiso de John Wiley & Sons Inc.

en los que se disociaron y mezclaron células de dos órganos diferentes en desarrollo, las células se agregaron inicialmente para formar un grupo mixto. Con el tiempo, sin embargo, las células se moverían dentro del agregado y, finalmente, se "separan en grupos" para que cada célula se adhiriera solo a las células del mismo tipo (véase figura 7-20*b*). Una vez separadas en un grupo homogéneo, estas células embrionarias a menudo se diferenciarían en muchas de las estructuras que habrían formado dentro de un embrión intacto.

Los investigadores han identificado docenas de diferentes proteínas involucradas en la adhesión celular. Se cree que diferentes matrices de estas moléculas en las superficies de distintos tipos de células son responsables de las interacciones específicas entre las células dentro de los tejidos complejos.

Cuatro familias diferentes de proteínas de membrana integrales desempeñan una función principal en la mediación de la adhesión célula-célula: 1) selectinas, 2) ciertos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF, *immunoglobulin superfamily*), 3) ciertos miembros de la familia de las integrinas y 4) cadherinas.

## Selectinas

Durante la década de 1960, se descubrió que los linfocitos que se habían extraído de los ganglios linfáticos periféricos, marcados radiactivamente e inyectados de nuevo en el cuerpo, regresarían a los sitios de los que se derivaron originalmente, un fenómeno llamado *homing de linfocito*. Posteriormente se descubrió que el homing podría estudiarse *in vitro* al permitir que los linfocitos se adhirieran a las secciones congeladas de los órganos linfoides. Bajo estas condiciones experimentales, los linfocitos se adherirían selectivamente al revestimiento endotelial de las vénulas (venas más pequeñas) de los ganglios linfáticos periféricos. Anticuerpos dirigidos contra una glucoproteína específica, llamada L selectina, en la superficie de los linfocitos, podrían bloquear la unión de los estos a las vénulas.

Las **selectinas** comprenden una familia de glucoproteínas integrales de membrana que reconocen y se unen a una disposición particular de azúcares en los oligosacáridos que se proyectan desde las superficies de otras células (consúltese sección 4.3). El nombre de esta clase de receptores de superficie celular se deriva de la palabra "lectina", un término general para un compuesto que se une a grupos específicos de carbohidratos. Las selectinas poseen un pequeño segmento citoplásmico, un único dominio de membranas y una gran porción extracelular que consta de varios dominios separados, incluido un dominio externo que actúa como lectina (véase **FIGURA 7-21*a***). Hay tres selectinas conocidas: selectina E, presente en las células endoteliales; selectina P, en plaquetas y células endoteliales, y selectina L, presente en los leucocitos (glóbulos blancos). Las tres selectinas reconocen una agrupación particular de azúcares (consúltese figura 7-21*a*) que se encuentra en los extremos de las cadenas de carbohidratos de ciertas glucoproteínas complejas. La unión de selectinas a sus ligandos de carbohidratos requiere calcio. Como grupo, las selectinas median las interacciones transitorias entre los leucocitos circulantes y las paredes de los vasos en los sitios de inflamación y coagulación. La captura de un leucocito es una tarea desafiante porque estas células están fluyendo a través del torrente sanguíneo a una tasa de velocidad considerable. Las selectinas son adecuadas para esta función porque los enlaces que forman con sus ligandos se hacen más fuertes cuando la interacción se somete a

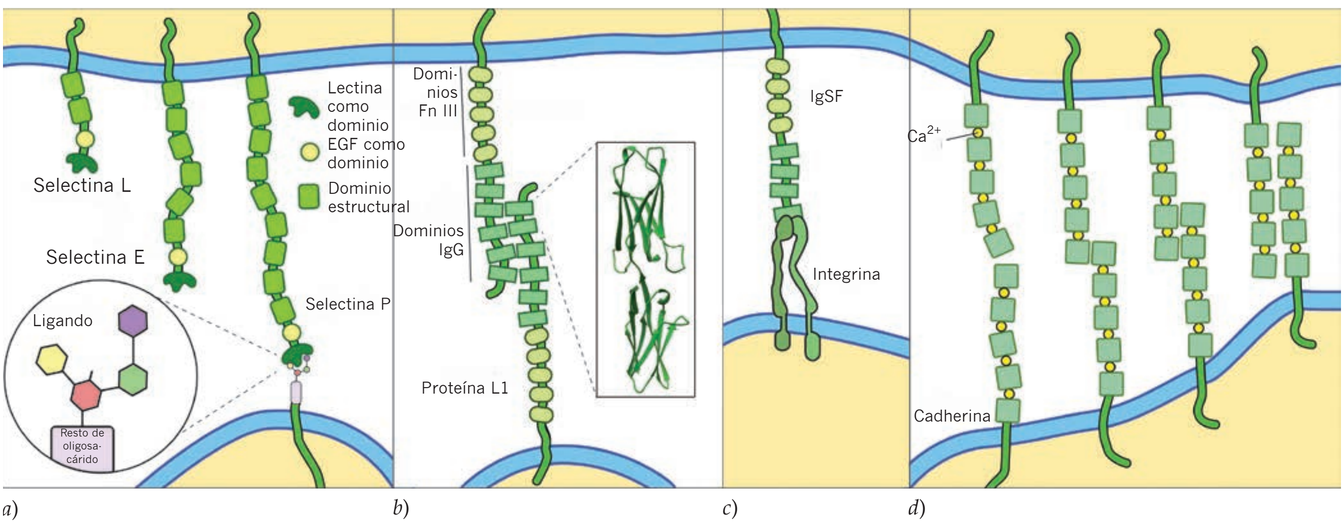



**FIGURA 7-21 Descripción general de las moléculas de adhesión celular.** *a*) **Selectinas.** Los tres tipos de selectinas conocidas reconocen y se unen a un ligando de carbohidrato similar en los extremos de las cadenas de los oligosacáridos en las glucoproteínas. En el recuadro se muestra la estructura detallada del ligando de carbohidratos. Los restos terminales de fucosa y el ácido siálico son particularmente importantes en el reconocimiento de la selectina, y el resto de *N*-acetilglucosamina a menudo está sulfatado. *b*) **Moléculas L1.** L1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig, *immunoglobulin*). La adhesión célula-célula resulta de las interacciones específicas de los dominios de inmunoglobulina (Ig) de dos moléculas L1 que se proyectan desde las superficies de las células vecinas. Cada molécula L1 contiene un pequeño dominio citoplásmico, un segmento transmembrana, varios segmentos que se parecen a un tipo de módulo que se encuentra en la fibronectina, y seis dominios Ig situados en la porción N terminal de la molécula. El recuadro muestra la estructura de los dos dominios de Ig N terminal de VCAM, una molécula de IgSF en la superficie de las células endoteliales. Los dominios de Ig de VCAM y L1 tienen una estructura tridimensional similar que consiste en dos hojas empaquetadas cara a cara. *c*) **Interacciones con Integrina-IgSF.** Los miembros de la familia IgSF también pueden unirse a las integrinas de las células vecinas. *d*) **Cadherinas.** La adhesión célula-célula resulta de las interacciones entre tipos similares de cadherinas que se proyectan desde la membrana plasmática de cada célula. Los iones de calcio (que se muestran como pequeñas esferas amarillas) están situados entre los dominios sucesivos de la molécula de cadherina, donde desempeñan una función crítica en el mantenimiento de la rigidez de la porción extracelular de la proteína. Esta ilustración muestra varios modelos alternativos por los cuales podrían interactuar las cadherinas de las células opuestas. Diferentes tipos de estudios han sugerido distintos grados de superposición (interdigitación) entre los dominios extracelulares de las moléculas de células opuestas. Para mejor comprensión, las figuras siguientes mostrarán cadherinas con una sola superposición de dominio, que probablemente sea la configuración predominante.

FUENTE: Recuadro de *b*) de E. Yvonne Jones, *et al. Nature* 1995;373:540; © 1995, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

estrés mecánico, como ocurre cuando el leucocito se aleja de un sitio determinado en la pared del vaso. La función de las selectinas en la inflamación se trata más ampliamente en "Perspectiva humana" en la sección 7.8.

## La superfamilia de inmunoglobulinas

La elucidación de la estructura de las moléculas de anticuerpos transportados por la sangre, en la década de 1960, fue uno de los hitos en nuestra comprensión de la respuesta inmune. Se encontró que los anticuerpos, que son un tipo de proteína llamada inmunoglobulina (o Ig), consisten en cadenas polipeptídicas compuestas de varios dominios similares. Cada uno de estos dominios de Ig, como se les llama, está compuesto de 70 a 110 aminoácidos organizados en una estructura fuertemente plegada, como se muestra en el recuadro de la figura 7-21*b*). El genoma humano codifica 765 dominios de Ig distintos, lo que lo convierte en el dominio más abundante en proteínas humanas. Tomadas como un grupo, estas proteínas son miembros de la **superfamilia de inmunoglobulinas** o **IgSF**. La mayoría de los miembros de la IgSF están involucrados en diversos aspectos de la función inmune, pero algunas de estas proteínas median en la adhesión célula-célula *independiente* del calcio. De hecho, el descubrimiento de dominios similares a Ig en los receptores de adhesión celular en animales invertebrados que carecen de un sistema inmune clásico sugiere que las proteínas similares a Ig originalmente evolucionaron como mediadores de la adhesión celular y solo de manera secundaria se encargaron de las funciones como efectores del sistema inmune en vertebrados.

La mayoría de las moléculas de adhesión celular IgSF median las interacciones específicas de los linfocitos con las células requeridas para una respuesta inmune (p. ej., macrófagos, otros linfocitos y células blanco). Sin embargo, algunos miembros de la IgSF, como VCAM (molécula de adhesión celular vascular [*vascular cell-adhesion molecule*]), NCAM (molécula de adhesión celular neural [*neural cell-adhesion molecule*]) y L1 (también llamada L1CAM), median en la adhesión entre células no inmunes. La NCAM y L1, por ejemplo, desempeñan funciones importantes en el crecimiento de nervios, la formación de sinapsis y otros eventos durante el desarrollo del sistema nervioso. Al igual que la fibronectina y muchas otras proteínas involucradas en la adhesión celular, las moléculas de adhesión celular IgSF tienen una construcción modular (consúltese figura 7-21*b*, *c*) y están compuestas de dominios individuales de estructura similar a los dominios en otras proteínas.

La importancia de L1 en el desarrollo neuronal se ha revelado de varias maneras. En los humanos, las mutaciones en el gen L1 pueden tener consecuencias devastadoras. En casos extremos, los bebés nacen con una enfermedad fatal de hidrocefalia ("agua en el cerebro"). Los niños con mutaciones menos graves suelen mostrar retraso mental y dificultad para controlar los movimientos de las extremidades (espasticidad). Las autopsias en pacientes que han muerto de una enfermedad por deficiencia de L1 revelan una condición notable: a menudo faltan dos grandes tractos nerviosos, uno que corre entre las dos mitades del cerebro y el otro que corre entre el cerebro y la médula espinal. La ausencia de tales tractos nerviosos sugiere que L1 está involucrado en el crecimiento dirigido de los axones dentro del sistema nervioso embrionario.

Varios tipos de proteínas sirven como ligandos para las moléculas de superficie celular IgSF. Como se describió anteriormente, la mayoría de las integrinas facilitan la adhesión de las células a su sustrato, pero unas pocas integrinas median en la adhesión célula-célula uniéndose a proteínas de otras células (véase figura 7-21*c*). Por ejemplo, la integrina $\alpha_4\beta_1$ en la superficie de los leucocitos se une a VCAM, una proteína IgSF en el revestimiento endotelial de ciertos vasos sanguíneos (véase sección 7.8).

## Cadherinas

Las **cadherinas** son una gran familia de glucoproteínas que median la adhesión célula-célula dependiente de $Ca^{2+}$ y transmiten señales desde la ECM al citoplasma. Las cadherinas generalmente unen las células de tipo similar entre sí y lo hacen predominantemente uniéndose a la misma cadherina presente en la superficie de la célula vecina. Esta propiedad de las cadherinas se demostró por primera vez mediante el diseño genético de células que normalmente no eran adhesivas por expresar una variedad de cadherinas diferentes. Las células se mezclaron en varias combinaciones y se monitorizaron sus interacciones. Se encontró que las células que expresan una especie de cadherina se adhieren preferentemente a otras células que expresan la misma cadherina. Este tipo de hallazgo ha llevado a los investigadores a creer que las cadherinas son en gran parte responsables de la capacidad de las células similares de "separar en grupos" los agregados mixtos, como se ilustra en la figura 7-20. De hecho, las cadherinas pueden ser el factor individual más importante al moldear las células en tejidos cohesivos en el embrión y mantenerlas juntas en el adulto. Como se discutió en "Perspectiva humana", la pérdida de la función de la cadherina puede desempeñar una función clave en la diseminación de tumores malignos.

Al igual que muchas otras proteínas involucradas en la adhesión, las cadherinas tienen una construcción modular. Las cadherinas mejor estudiadas son la cadherina E (epitelial), cadherina N (neuronal) y cadherina P (placenta). Estas cadherinas "clásicas", como se les llama, contienen un segmento extracelular relativamente grande que consta de cinco dominios en tándem de tamaño y estructura similares, un único segmento transmembrana y un dominio citoplásmico pequeño (véase figura 7-21*d*). El dominio citoplasmático a menudo se asocia con miembros de la familia de proteínas citosólicas *catenina*, que tienen una doble función: unen las cadherinas al citoesqueleto (véase figura 7-25) y transmiten señales al citoplasma y al núcleo. En la figura 7-21*d*) se muestran varios modelos de adhesión de cadherina. Los estudios estructurales indican que las cadherinas de la misma superficie celular se asocian lateralmente para formar dímeros paralelos. Estos estudios también arrojan luz sobre la función del calcio, que se sabe desde hace décadas que es esencial para la adhesión célula-célula. Como se indica en la figura 7-21*d*), los iones de calcio forman puentes entre los dominios sucesivos de una molécula determinada. Estos iones de calcio mantienen la porción extracelular de cada cadherina en una conformación rígida requerida para la adhesión celular. La adhesión entre las células resulta de la interacción entre los dominios extracelulares de las cadherinas de las células opuestas para formar un "cremallera de adhesión celular". Diferentes tipos de células con distintas cadherinas probablemente participen en distintas tipos de interacciones, de modo que muchas configuraciones distintas (como se muestra en la figura 7-21*d*) puede ocurrir dentro de un organismo. Así como la interdigitación de la cadherina se puede comparar con una cremallera, los grupos de cadherina se pueden comparar con Velcro; cuanto mayor es el número de cadherinas que interactúan en un grupo, mayor es la fuerza de adhesión entre las células que se adhieren.

El desarrollo embrionario se caracteriza por el cambio: cambio en la expresión génica, cambio en la forma de la célula, cambio en la motilidad celular, cambio en la adhesión celular, y así sucesivamente. Se piensa que las cadherinas median muchos de los cambios dinámicos en los contactos adhesivos que se requieren para construir los tejidos y órganos de un embrión, lo que se conoce como el proceso de *morfogénesis*. Por ejemplo, una cantidad de eventos morfogenéticos durante el desarrollo embrionario involucran un grupo de células que cambian desde un epitelio (fuertemente adherido, apical-basal polarizado, capa celular estacionaria) a un mesénquima (células migratorias solitarias, no adhesivas, no polarizadas), o viceversa. La **transición**

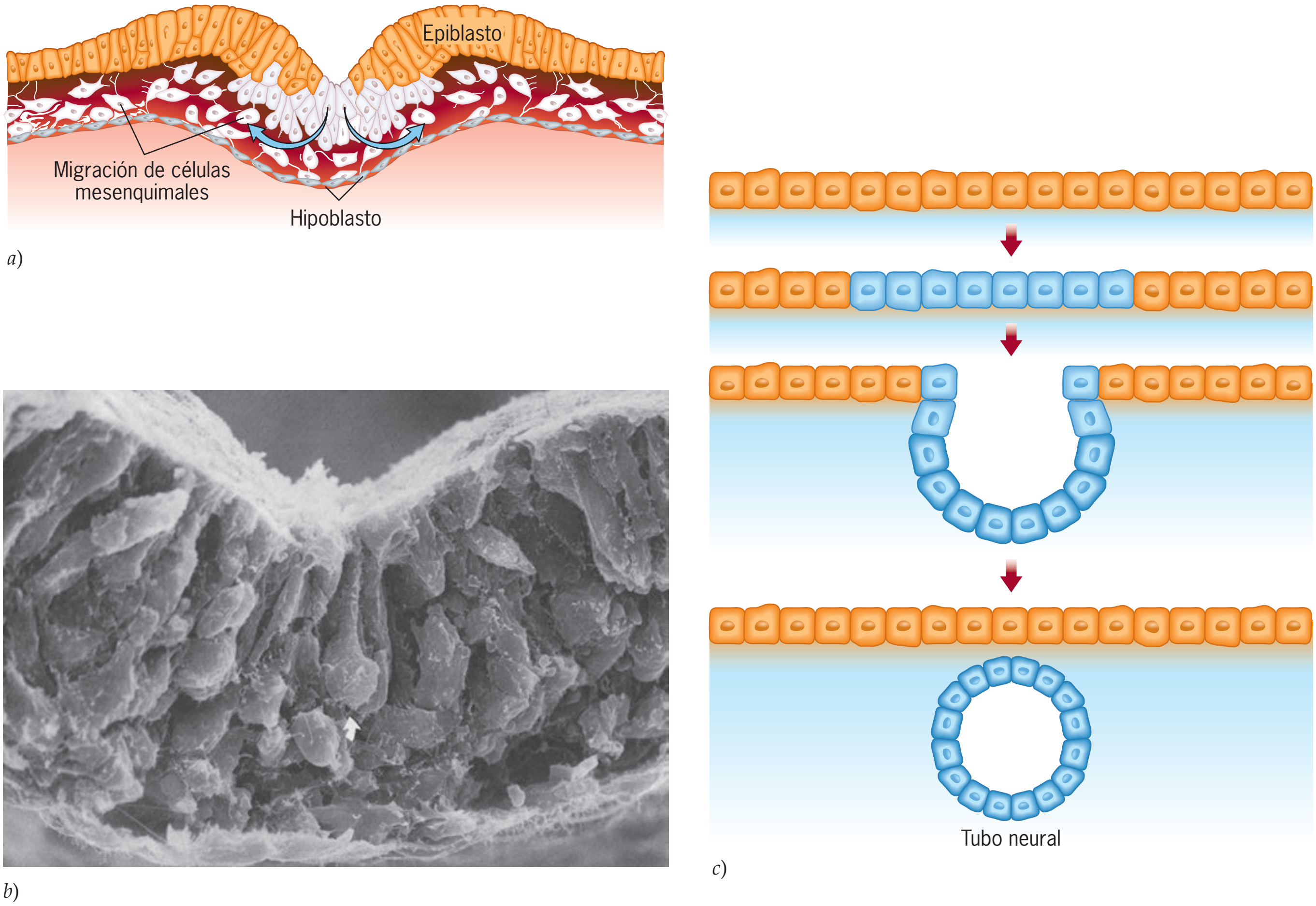



**FIGURA 7-22 Cadherinas y morfogénesis.** *a*) Durante la gastrulación, las células en la capa superior del embrión (epiblasto) se mueven hacia un surco en el centro del embrión, se hunden en la ranura y luego migran lateralmente como células mesenquimales en el espacio debajo del epiblasto. Esta transición epitelio-mesénquima está marcada por una pérdida de expresión de la cadherina E que es característica de las células epiteliales. Las células que expresan cadherina E se representan en naranja. *b*) Micrografía electrónica de barrido de un embrión de pollo durante la gastrulación que ha sido fracturada para revelar las células que experimentan la transición epitelio-mesénquima (flecha) representada en la parte *a*). *c*) Esta secuencia de dibujos representa el desarrollo del tubo neural, que es una capa epitelial que se forma por separación de la capa subyacente del ectodermo dorsal. En el dibujo superior, las células epiteliales expresan cadherina E. En los dibujos inferiores, las células del tubo neural dejan de expresar cadherina E (naranja) y en su lugar expresan cadherina N (azul).

FUENTE: Cortesía de Michael Solursh y Jean Paul Revel.

**epitelio-mesénquima** (o **EMT**, *epitelial-mesenchymal transition*) se ilustra mediante la formación del mesodermo durante la gastrulación en un pollo o embrión de mamífero. Por lo general, estas células se desprenden de una capa epitelial cohesiva (llamada epiblasto) en la superficie dorsal del embrión temprano y migran hacia las regiones interiores como células mesenquimales (véase **FIGURA 7-22*a*, *b***). Estas células mesenquimales eventualmente darán lugar a tejidos mesodérmicos como sangre, músculo y hueso. Las células del epiblasto muestran cadherinas E en su superficie, lo que supuestamente promueve la estrecha asociación entre ellas. Antes de su separación del epiblasto, las futuras células mesodérmicas dejan de expresar cadherina E, que se cree que promueve su liberación del epitelio y la transformación en células mesenquimales (véase figura 7-22*a*). En una etapa posterior del desarrollo, otro evento importante, la formación del sistema nervioso primitivo, también se caracteriza por cambios en la expresión de la cadherina. Después de la gastrulación, la superficie dorsal del embrión está cubierta por una capa epitelial unicelular, que se convertirá en los tejidos ectodérmicos del animal (incluidos piel y sistema nervioso). En esta etapa, las células en la región central de esta capa dejan de expresar cadherina E y comienzan a expresar cadherina N (véase figura 7-22 *c*). En las etapas posteriores, las células epiteliales que expresan cadherina N se separan de sus vecinas en ambos lados y ruedan hacia el tubo neural, que luego se convertirá en el cerebro y la médula espinal del animal. Se cree que las cadherinas (y otras moléculas de adhesión celular) desempeñan una función clave en estos eventos al cambiar las propiedades adhesivas de las células.

Hasta la fecha, se han identificado más de 100 cadherinas en humanos, muchas de las cuales se cree que son funcionalmente redundantes. Sin embargo, las mutaciones únicas en varias cadherinas se han relacionado con enfermedades genéticas. Uno de los más notables es el **síndrome de Usher**, que se caracteriza por sordera y pérdida gradual de la visión. Varias mutaciones genéticas pueden provocar síndrome de Usher, pero las mutaciones en la cadherina 23 o protocadherina 15 causan algunas de las formas más graves de la enfermedad. Estas cadherinas no clásicas forman una cuerda fina, llamada uniones de punta, entre los estereocilios adyacentes en la superficie de las células ciliadas en el oído interno, como se muestra en la **FIGURA 7-23**. Las uniones de punta son esenciales para convertir el movimiento mecánico de los estereocilios (causados por ondas de sonido) en una corriente eléctrica, y también tienen una función estructural crítica en el mantenimiento de la organización estereociliar. Las mutaciones

en estas uniones de punta pueden provocar graves defectos en la organización y el desarrollo de estereocilios, lo que resulta en sordera profunda.

**REPASO**

1. ¿Qué tipo(s) de unión celular contiene(n) filamentos de actina? ¿Cuál(es) contiene(n) filamentos intermedios? ¿Cuál(es) contiene(n) integrinas? ¿Cuál(es) contiene(n) cadherinas?
2. ¿Cómo difieren las cadherinas, los miembros de la IgSF y las selectinas a nivel molecular en la forma en que median la adhesión célula-célula?

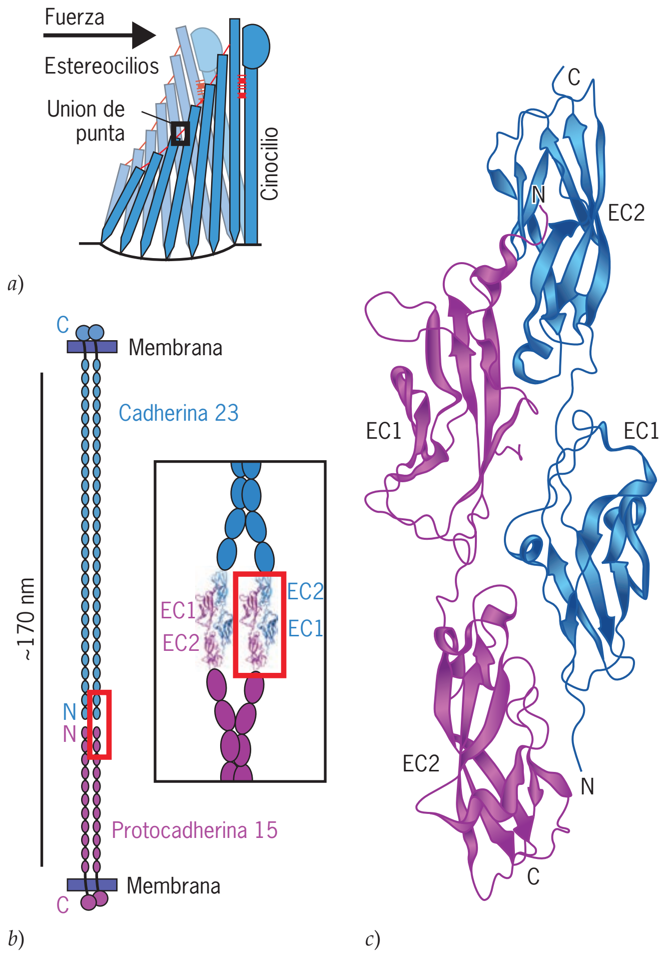



**FIGURA 7-23 Las cadherinas forman uniones de punta de estereocilios.** La cadherina 23 y la protocadherina 15 forman las uniones de punta de los estereocilios que desempeñan una función clave en la conversión de la fuerza mecánica, en ondas de sonido, en señales eléctricas que se transmiten al cerebro. *a*) Aquí se muestra un dibujo esquemático de estereocilios, que se encuentran en células conocidas como células ciliadas en el oído interno. Las uniones de punta están coloreadas en rojo. La estructura de la unión de punta se muestra en *b*), con la cadherina 23 en azul y la protocadherina en color morado. La estructura cristalina de los dominios que interactúan se muestra en *c*).

FUENTE: De M. Sotomayor, *et al.* Reproducida con permiso de Macmillan Publishers Ltd. *Nature* 2012;492:128-32.

# 7.8 PERSPECTIVA HUMANA

## La función de la adhesión celular en la inflamación y metástasis

La inflamación es una de las principales respuestas a la infección. Si una parte del cuerpo se contamina con bacterias, como podría ocurrir después de una herida punzante en la piel, el sitio de la lesión se convierte en un imán para una variedad de glóbulos blancos. Los glóbulos blancos (leucocitos) que normalmente permanecerían en el torrente sanguíneo se estimulan para atravesar la capa endotelial que recubre las venas más pequeñas (vénulas) en la región y entran en el tejido. Una vez en el tejido, los leucocitos se mueven en respuesta a señales químicas hacia los microorganismos invasores, a los que ingieren.* Aunque la inflamación es una respuesta protectora, también produce efectos secundarios adversos, como fiebre, edema debido a la acumulación de líquidos, enrojecimiento y dolor.

La inflamación también puede desencadenarse de forma inapropiada. Por ejemplo, el daño a los tejidos del corazón o el cerebro puede ocurrir cuando el flujo de sangre a estos órganos se bloquea durante un infarto cardiaco o una enfermedad cerebrovascular. Cuando se restablece la sangre del órgano, los leucocitos circulantes pueden atacar el tejido dañado, lo que causa una afección conocida como *daño por reperfusión*. Una respuesta inflamatoria demasiado intensa también puede provocar asma, síndrome de choque tóxico y síndrome de dificultad respiratoria. Una gran cantidad de investigaciones se han centrado en preguntas relacionadas con estas afecciones: ¿Cómo se reclutan los leucocitos en los sitios de inflamación? ¿Cómo son capaces los leucocitos de dejar de fluir a través del torrente sanguíneo y adherirse a las paredes de los vasos? ¿Cómo penetran las paredes de los vasos? ¿Cómo se pueden bloquear algunos de los efectos secundarios negativos de la inflamación sin interferir con los aspectos beneficiosos de la respuesta? Las respuestas a las preguntas sobre la inflamación se han centrado en tres tipos de moléculas de adhesión celular: las selectinas, las integrinas y las proteínas IgSF.

En la **FIGURA 1** se muestra una cadena de eventos que se ha propuesto que ocurra durante la inflamación aguda. El primer paso comienza cuando las paredes de las vénulas se activan en respuesta a las señales químicas del tejido dañado cercano. Las células endoteliales que recubren estas vénulas se vuelven más adhesivas a los neutrófilos circulantes, un tipo de leucocito fagocítico que lleva a cabo un ataque rápido y no específico sobre los patógenos invasores. Este cambio en la adhesión está mediado por una presentación temporal de las selectinas E y P en las superficies de las células endoteliales activadas en el área dañada (paso 2, véase figura 1). Cuando los neutrófilos encuentran las selectinas, forman adhesiones transitorias que ralentizan

* Se puede encontrar en la web una película notable de un leucocito que "persigue" a una bacteria buscando las palabras clave "arrastre de neutrófilo".

(*continúa*)

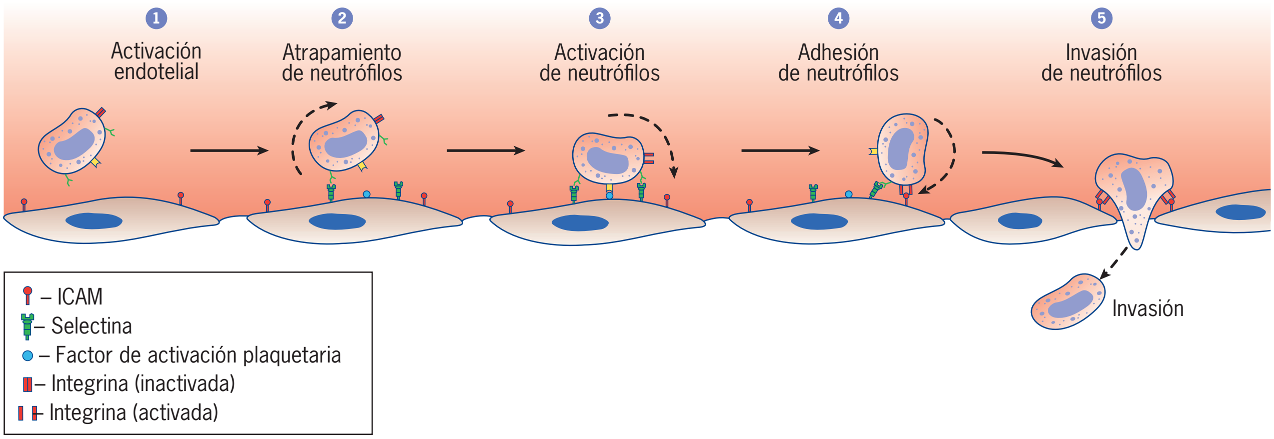



**FIGURA 1 Pasos en el movimiento de neutrófilos del torrente sanguíneo durante la inflamación.** Los pasos se describen en el texto.

drásticamente su movimiento a través del vaso. En esta etapa, se puede ver que los neutrófilos "ruedan" lentamente a lo largo de la pared del vaso. Varias compañías de biotecnología están intentando desarrollar fármacos antiinflamatorios que actúen al interferir con la unión de ligandos a las selectinas E y P. Los anticuerpos antiselectina bloquean la circulación de neutrófilos sobre superficies recubiertas con selectina *in vitro* y suprimen la inflamación y el daño por reperfusión en los animales. Se ha logrado un tipo similar de efecto de bloqueo con carbohidratos sintéticos (p. ej., efomicines) que se unen a selectina E y P, y compiten de ese modo con ligandos de carbohidratos en las superficies de los neutrófilos.

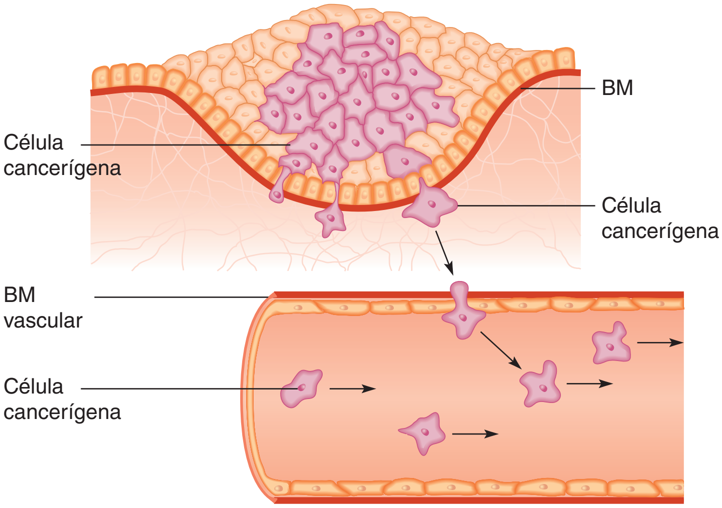
A medida que los neutrófilos interactúan con el endotelio venular inflamado, las interacciones tienen lugar entre otras moléculas en las superficies de los dos tipos de células. Una de las moléculas que se muestran en la superficie de las células endoteliales es un fosfolípido llamado factor activador de plaquetas (PAF, *platelet activating factor*). El PAF se une a un receptor en la superficie del neutrófilo y envía una señal al neutrófilo que conduce a un aumento en la actividad de unión de ciertas integrinas (p. ej., $\alpha_1\beta_2$ y $\alpha_4\beta_1$) ya situadas en la superficie de los neutrófilos (paso 3, véase figura 1). Este es un ejemplo del tipo de señal de adentro hacia afuera que se ilustra en la figura 7-13. Las integrinas activadas se unen con alta afinidad a moléculas de IgSF (p. ej., ICAM-1 y VCAM-1) en la superficie de las células endoteliales, lo cual hace que los neutrófilos detengan su rodamiento y se adhieran firmemente a la pared del vaso (paso 4). Los neutrófilos unidos luego cambian su forma y se comprimen entre las células endoteliales adyacentes en el tejido dañado (paso 5). Los neutrófilos invasores parecen capaces de desensamblar las uniones adherentes (consúltese sección 7.9) que forman la principal barrera entre las células de la pared del vaso. Esta cascada de eventos, que involucra varios tipos diferentes de moléculas de adhesión celular, asegura que la unión de las células sanguíneas a las paredes de los vasos sanguíneos y la posterior penetración ocurrirá solo en los sitios donde se requiere la invasión de los leucocitos.

La importancia de las integrinas en la respuesta inflamatoria se demuestra por una enfermedad rara llamada *deficiencia de adhesión leucocitaria* (LAD, *leukocyte adhesion deficiency*). Las personas con la forma tipo I de LAD no pueden producir la subunidad $\beta_2$ como parte de varias integrinas leucocitarias. Como resultado, los leucocitos de estos individuos carecen de la capacidad de adherirse a la capa endotelial de las vénulas, un paso necesario para su salida del torrente sanguíneo. Estos pacientes sufren de infecciones bacterianas repetidas que amenazan la vida. La mejor forma de tratar la enfermedad es mediante el trasplante de médula ósea, que proporciona al paciente células madre capaces de formar leucocitos normales. La administración de anticuerpos contra la subunidad $\beta_2$ puede simular los efectos de la LAD, al bloquear el movimiento de neutrófilos y otros leucocitos fuera de los vasos sanguíneos. Tales anticuerpos podrían ser útiles para prevenir las respuestas inflamatorias asociadas con enfermedades como el asma y la artritis reumatoide o con la reperfusión.

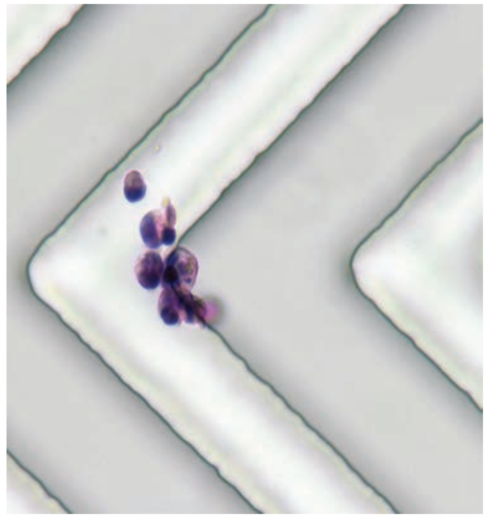
El cáncer es una enfermedad en la cual las células escapan de los mecanismos normales de control de crecimiento del cuerpo y proliferan de manera no regulada. Si las células malignas permanecieran en una sola masa, como ocurre a menudo en algunos tipos de cáncer de piel o cáncer de tiroides, la mayoría de los cánceres se curarían fácilmente mediante la extirpación quirúrgica del tejido enfermo. La mayoría de los tumores malignos, sin embargo, engendran células que son capaces de abandonar la masa tumoral primaria y entrar al torrente sanguíneo o a los canales linfáticos, lo cual inicia el crecimiento de tumores secundarios en otras partes del cuerpo (véase **FIGURA 2*a***). La diseminación de un tumor dentro del cuerpo se llama **metástasis** y es la razón por la que el cáncer es una enfermedad tan devastadora. Se cree que las células metastásicas (células cancerosas que pueden iniciar la formación de tumores secundarios) tienen propiedades especiales de la superficie celular que no comparten la mayoría de las otras células del tumor. Por ejemplo:

1. Las células metastásicas deben ser menos adhesivas que otras células para liberarse de la masa tumoral.
2. Las células metastásicas deben ser capaces de penetrar numerosas barreras, como las matrices extracelulares del tejido conectivo circundante y las membranas basales que subyacen al epitelio y recubren los vasos sanguíneos que las llevan a sitios distantes (véase figura 2*a*). Aunque la presencia de células cancerosas en el torrente sanguíneo es una circunstancia potencialmente letal, brinda una oportunidad para el acceso no quirúrgico al cáncer de un paciente. Recientemente se han desarrollado varios dispositivos para atrapar raras células tumorales circulantes (CTC, *circulating tumor cells*) presentes en muestras de sangre tomadas de pacientes con cáncer (véase figura 2*b*). Una vez que han sido capturadas, se pueden estudiar las CTC de un paciente para determinar las características moleculares del tumor, cuán agresivo es, cómo se puede tratar mejor y qué tan bien progresa una terapia en particular como se refleja en la disminución del número de CTC en el tiempo. Algún día, las CTC podrán usarse como base para la detección temprana de la enfermedad.
3. Las células metastásicas deben ser capaces de invadir los tejidos normales y sobrevivir para formar colonias secundarias. Por alguna razón, este tercer paso parece representar el mayor obstáculo en el proceso de metástasis para la mayoría de los tipos de tumores. En consecuencia, solo una fracción muy pequeña de las células cancerosas que salen del torrente sanguíneo suelen producir tumores secundarios viables.

Los mecanismos utilizados por las células cancerosas para penetrar las matrices extracelulares son poco conocidos porque tales eventos han sido prácticamente imposibles de estudiar




a)



b)

**FIGURA 2 Pasos que conducen a la diseminación metastásica de un cáncer epitelial (un carcinoma).** *a*) Una fracción de las células de tumor primario pierde su adhesividad a otras células tumorales y adquiere la capacidad de penetrar la barrera de la membrana basal (BM) que subyace al tejido epitelial. Estas células, que han asumido una apariencia de tipo mesenquimal, migran a través del tejido estromal circundante y cruzan la BM de un vaso sanguíneo o linfático, e ingresan así a la circulación general. Las células se transportan a otros tejidos, donde migran hacia atrás a través de la BM de los vasos y entran en un tejido en el que pueden formar tumores secundarios. Solo un porcentaje muy pequeño de células tumorales que se liberan de un tumor primario logran superar estos numerosos obstáculos, pero aquellas que lo hacen representan una amenaza para la vida del anfitrión. *b*) Estas células tumorales circulantes (CTC) se han aislado a partir de una muestra de sangre de un paciente con cáncer de próstata. Aunque la sangre de un paciente con cáncer puede contener menos de una célula cancerosa por cada mil millones de células normales, estas células cancerosas raras pueden atraparse selectivamente en un chip que ha sido recubierto con moléculas de anticuerpos dirigidas contra una proteína de superficie celular (en este caso, EpCAM) que está presente en las células cancerosas y está ausente de las células sanguíneas normales.

FUENTE: *a*) R. G. Rowe, S. J. Weiss. *Trends Cell Biology* 2008;18:562, Copyright 2008, con permiso de Elsevier Science. *Trends in Cell Biology* por Elsevier Ltd. Reproducida con permiso de Elsevier Ltd. en formato Journal vía Copyright Clearance Center; *b*) de Min Yu, Shannot Stott, *et al*. Portada de *J Cell Biol* 2011;192:3, cortesía de Daniel A. Haber, Shannon Stott, y Min Yu. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

dentro de los tejidos de un animal vivo. Se cree que el movimiento a través de las membranas basales se logra principalmente mediante enzimas que digieren la ECM, especialmente las metaloproteinasas de matriz (MMP, *matrix metalloproteinases*) discutidas en la página 231. Se supone que estas enzimas degradan las proteínas y proteoglucanos que se interponen en la migración de células cancerosas. En algunos tipos de células cancerosas, las MMP se asocian directamente con las proyecciones de células largas, llamadas *invadopodia*, que se abren paso a través de la ECM. Entre otras funciones promotoras de tumores de las MMP, la segmentación de ciertas proteínas de la ECM produce fragmentos de proteína activa en la superficie celular que actúan sobre las células cancerosas para estimular su crecimiento y carácter invasivo. Debido a su función aparente en el desarrollo de tumores malignos, las MMP se convirtieron en un objetivo destacado de la industria farmacéutica. Una vez que se demostró que los inhibidores sintéticos de MMP podían reducir la metástasis en ratones, se realizaron varios ensayos clínicos de estos fármacos en pacientes con una variedad de cánceres avanzados e inoperables. Desafortunadamente, estos inhibidores han demostrado poco impacto en la detención de la progresión tumoral en etapa tardía y, en algunos casos, han provocado daño en las articulaciones. Hasta la fecha, el único inhibidor de MMP aprobado por la FDA (Periostat) se usa para tratar la enfermedad periodontal.

Los estudios han demostrado que los cambios en la ECM en sí acompañan a muchas enfermedades, incluido el cáncer. En el cáncer de mama, por ejemplo, la ECM que rodea las células tumorales puede ser hasta 10 veces más rígida, lo que da como resultado la capacidad de sentir un "nódulo" durante un examen de los senos. Se cree que esta rigidez aumentada se debe a un aumento de los enlaces cruzados en el colágeno y otros componentes de la ECM. Además, los tumores de mama muestran un aumento en las formas lineales y agrupadas de colágeno en comparación con el tejido mamario normal. Esta reorganización de la ECM por el tejido canceroso parece desempeñar una función importante en las metástasis, porque el colágeno más rígido y agrupado tiende a promover la migración celular.

Los cambios en los números y tipos de varias moléculas de adhesión celular y, por tanto, la capacidad de las células para adherirse a otras células o a matrices extracelulares, también se han visto implicadas en la promoción de la metástasis. El mayor enfoque en esta área se ha centrado en la cadherina E, que es la molécula predominante de adhesión celular de las uniones adherentes que mantienen las células epiteliales en una lámina cohesiva. En la página 240 se describe cómo la pérdida de cadherina E de las células epiteliales durante ciertos eventos de desarrollo embrionario se asocia con la conversión de las células en un fenotipo mesenquimal menos adhesivo y más móvil. Una transición epitelio mesénquima notablemente similar se produce en los bordes periféricos de un tumor, ya que las células malignas se separan de la masa tumoral primaria e invaden el tejido normal adyacente (véase figura 2*a*). Este es un paso importante en el proceso de metástasis. Los estudios de una variedad de tumores de células epiteliales (p. ej., cánceres de mama, próstata y colon) confirman que estas células malignas tienen niveles muy reducidos de cadherina E; cuanto menor sea el nivel de expresión de cadherina E, mayor será el potencial metastásico de la célula. Por el contrario, cuando las células malignas se ven obligadas a expresar copias adicionales del gen cadherina E, las células son mucho menos capaces de causar tumores cuando se inyectan en animales huésped. Se cree que la presencia de cadherina E favorece la adhesión de las células entre sí y suprime la dispersión de las células tumorales a sitios distantes. La cadherina E también puede inhibir las vías de señalización dentro de la célula que conducen a la invasión tisular y la metástasis. La importancia de la cadherina E es evidente a partir del estudio de una familia de neozelandeses nativos que habían perdido a 25 miembros de cáncer de estómago durante un periodo de 30 años. El análisis del DNA de los miembros de la familia ha revelado que los individuos susceptibles tienen mutaciones en el gen que codifica cadherina E.

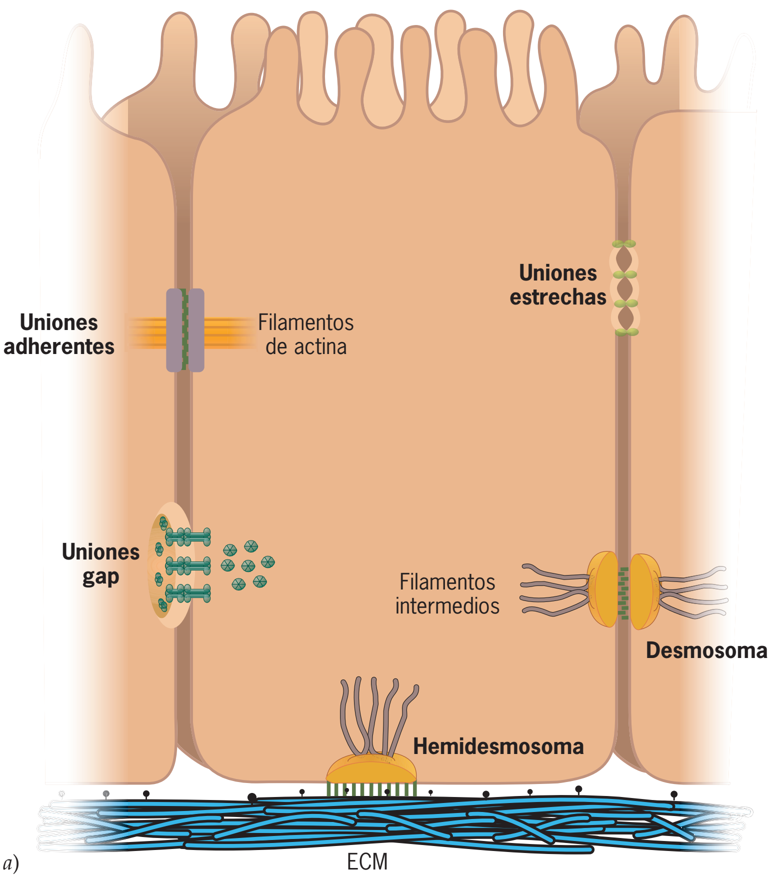
## 7.9 Uniones adherentes y desmosomas



Mientras que las cadherinas se distribuyen normalmente de forma difusa a lo largo de las superficies de dos células adherentes, también participan en la formación de uniones intercelulares especializadas llamadas *uniones adherentes* y *desmosomas*. Además de estas uniones adhesivas, las células epiteliales a menudo contienen otros tipos de uniones celulares, denominadas *uniones estrechas* y *uniones gap*, que se analizarán más adelante en este capítulo.

Las **uniones adherentes** se encuentran en una variedad de sitios dentro del cuerpo. Son particularmente comunes en los epitelios, como el revestimiento del intestino, donde aparecen como "bandas" (o *zonulae adherens*) que rodean cada una de las células cerca de su superficie apical y unen esa célula con sus vecinos circundantes (véase **FIGURA 7-24**). En una unión adherente, las células se mantienen juntas mediante enlaces dependientes de calcio formados entre los dominios extracelulares de las moléculas de cadherina que tienden un puente de unión de 30 nm entre las células vecinas (véase **FIGURA 7-25**). Como se ilustra en la figura 7-25*a-b*), el dominio citoplásmico de estas cadherinas está unido por cateninas α y β a una variedad de proteínas citoplásmicas, incluidos los filamentos de la actina del citoesqueleto. Así, al igual que las integrinas de una adhesión focal, los grupos de cadherina de una unión adherente 1) conectan el entorno externo con la actina del citoesqueleto y 2) proporcionan una vía para que las señales se transmitan desde el exterior de la célula al citoplasma. Para poner un ejemplo, las uniones adherentes situadas entre las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos transmiten señales que aseguran la supervivencia de las células. Los ratones que carecen de una cadherina de células endoteliales son incapaces de transmitir estas señales de supervivencia, y estos animales mueren durante el desarrollo embrionario como resultado de la muerte de las células que recubren las paredes del vaso.

Los **desmosomas** (o *macula adherens*) son uniones adhesivas en forma de disco de aproximadamente 1 μm de diámetro (véase figura 7-26) que se encuentran en una variedad de tejidos. Los desmosomas son particularmente numerosos en tejidos que están sujetos a estrés mecánico, como el músculo cardiaco y las capas epiteliales de la piel y el cuello uterino. Al igual que las uniones adherentes, los desmosomas contienen cadherinas que unen dos células a través de una unión estrecha extracelular. Las cadherinas de los desmosomas tienen una estructura de dominio diferente de las cadherinas clásicas encontradas en las uniones adherentes y se denominan *desmogleínas* y *desmocolinas* (véase figura 7-25*b*). Las placas citoplásmicas densas en la superficie interna de las membranas plasmáticas sirven como sitios de anclaje para el bucle de filamentos intermedios similares a los de



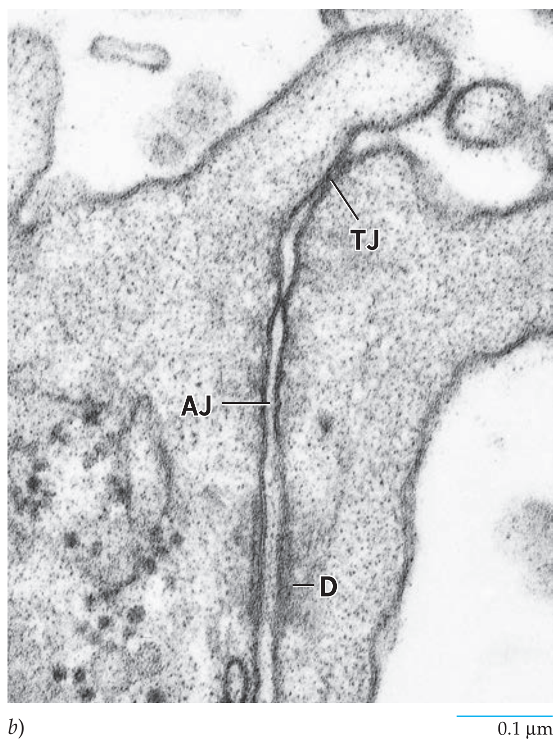




**FIGURA 7-24 Complejo de unión intercelular.** *a*) Diagrama esquemático en el que se muestra el complejo de unión en las superficies laterales de una célula de epitelio columnar simple. El complejo consiste en una unión estrecha (*zonula occludens*), una unión adherente (*zonula adherens*) y un desmosoma (*macula adherens*). Otros desmosomas y uniones gap se localizan profundamente a lo largo de las superficies laterales de las células. Las uniones adherentes y las uniones estrechas circundan a la célula, mientras que los desmosomas y las uniones gap están restringidos a un sitio particular entre las células adyacentes. Los hemidesmosomas están presentes en la superficie de las células basales. *b*) Micrografía electrónica de un complejo de unión entre dos células epiteliales de la vía respiratoria de una rata. (TJ [*tight junction*]: unión estrecha; AJ [*adherens junction*]: unión adherente; D [*desmosome*]: desmosoma).

FUENTE: *b*) De Eveline E. Schneeberger y Robert D. Lynch, *Am J Physiol* 1992;262:l648. © The American Physiological Society (APS). Todos los derechos reservados.

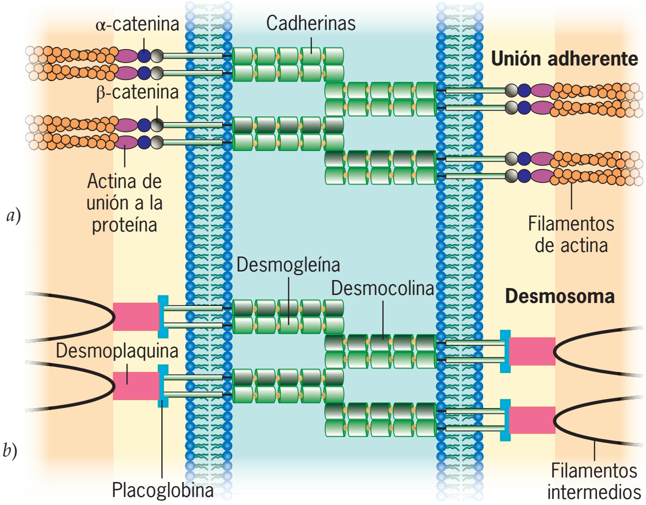



**FIGURA 7-25 Modelo esquemático de la arquitectura molecular de una unión adherente y un desmosoma.** *a*) El dominio citoplasmático de cada molécula de cadherina está conectado a los filamentos de la actina del citoesqueleto con la unión de las proteínas, que incluyen la β-catenina, la α-catenina, y varias proteínas de unión a la actina. Una de estas proteínas de unión a la actina es la formina, que participa en la polimerización de los filamentos de actina. *b*) Modelo esquemático de la arquitectura molecular de un desmosoma. Las cadherinas especializadas, denominadas desmogleína y desmocolina, se unen entre sí en el espacio extracelular. En el citoplasma, las cadherinas desmosómicas se unen de forma indirecta a los filamentos intermedios.

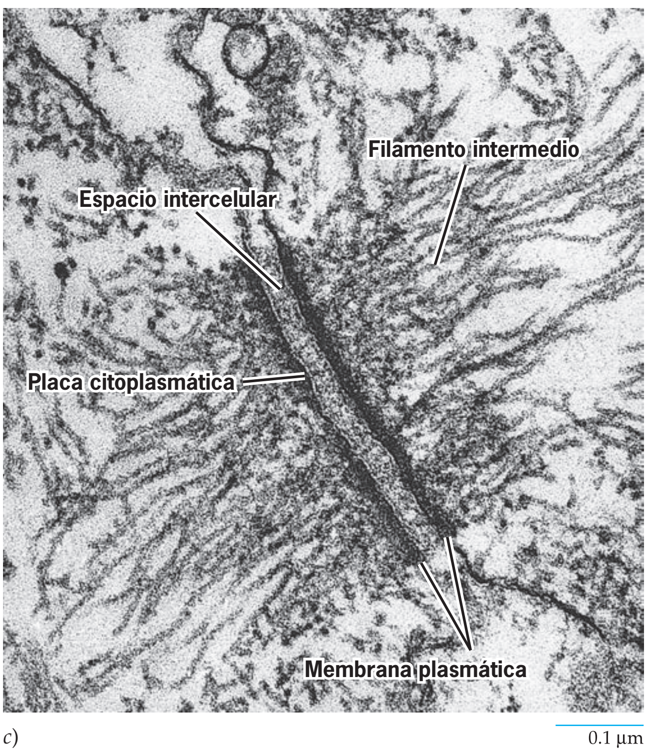



**FIGURA 7-26 Las cadherinas especializadas, llamadas desmogleína y desmocolina, se unen entre sí en el espacio extracelular.** En el citoplasma, las cadherinas desmosómicas se unen de forma indirecta a los filamentos intermedios. Micrografía electrónica de un desmosoma de la epidermis de una salamandra.

FUENTE: De Douglas E. Kelly. *J Cell Biol* 1966;28:51, fig. 10. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

los hemidesmosomas (véase figura 7-19). La red tridimensional de los filamentos intermedios a modo cuerdas proporciona continuidad estructural y resistencia a la tracción a toda la hoja de las células. Los filamentos intermedios se unen a los dominios citoplasmáticos de las cadherinas desmosómicas mediante proteínas adicionales, como se representa en la **FIGURA 7-26**. La importancia de las cadherinas para mantener la integridad estructural de un epitelio se ilustra a través de una enfermedad autoinmune (*pénfigo vulgar*) en la que se producen anticuerpos contra una de las desmogleínas. La enfermedad se caracteriza por pérdida de la adhesión celular a las células epidérmicas y ampollas severas de la piel.

**REPASO**

1. Distinga entre un hemidesmosoma y un desmosoma; un desmosoma y una unión adherente.

## 7.10 Función de los receptores de adhesión celular en la señalización transmembrana

Una de las funciones de las proteínas integrales de membrana es transferir información a través de la membrana plasmática, un proceso conocido como **señalización transmembrana**. Si bien el tema será explorado en detalle en el capítulo 15, se puede observar que los cuatro tipos de moléculas de adhesión celular ilustradas en la figura 7-21 tienen el potencial de llevar a cabo esta función. Por ejemplo, las integrinas y las cadherinas pueden transmitir señales del entorno extracelular al citoplasma por medio de enlaces con el citoesqueleto y con las moléculas reguladoras citosólicas, como las proteínas cinasas y las proteínas G. Las proteínas cinasas activan (o inhiben) sus proteínas blanco a través de la fosforilación, mientras que las proteínas G activan (o inhiben) sus proteínas blanco a través de la interacción física (véase figura 15-21*b*). El compromiso de una integrina con su ligando puede inducir una variedad de respuestas dentro de una célula, incluyendo cambios en el pH citoplásmico o la concentración del $Ca^{2+}$, la fosforilación de proteínas y la expresión génica. Estos cambios, a su vez, pueden alterar el potencial de crecimiento, la actividad migratoria, el estado de diferenciación o la supervivencia de una célula.

## 7.11 Uniones estrechas: sello del espacio extracelular

Un epitelio simple, como el revestimiento del intestino o los pulmones, se compone de una capa de células que se adhieren de forma estrecha entre sí para formar una lámina celular. Los biólogos han sabido durante décadas que cuando ciertos tipos de epitelio, como la piel de rana o la pared de la vejiga urinaria, se montan entre dos compartimientos que contienen diferentes concentraciones de soluto, se observa muy poca difusión de iones o solutos a través de la pared del epitelio desde un compartimiento al otro. Dada la impermeabilidad de las membranas plasmáticas, no es sorprendente que los solutos no se difundan libremente a través de las células de una capa epitelial. Pero, ¿por qué no pueden pasar entre las células por la *vía paracelular* (como en la **FIGURA 7-27*a***)? La razón se hizo evidente durante la década de 1960 con el descubrimiento de contactos especializados, llama-

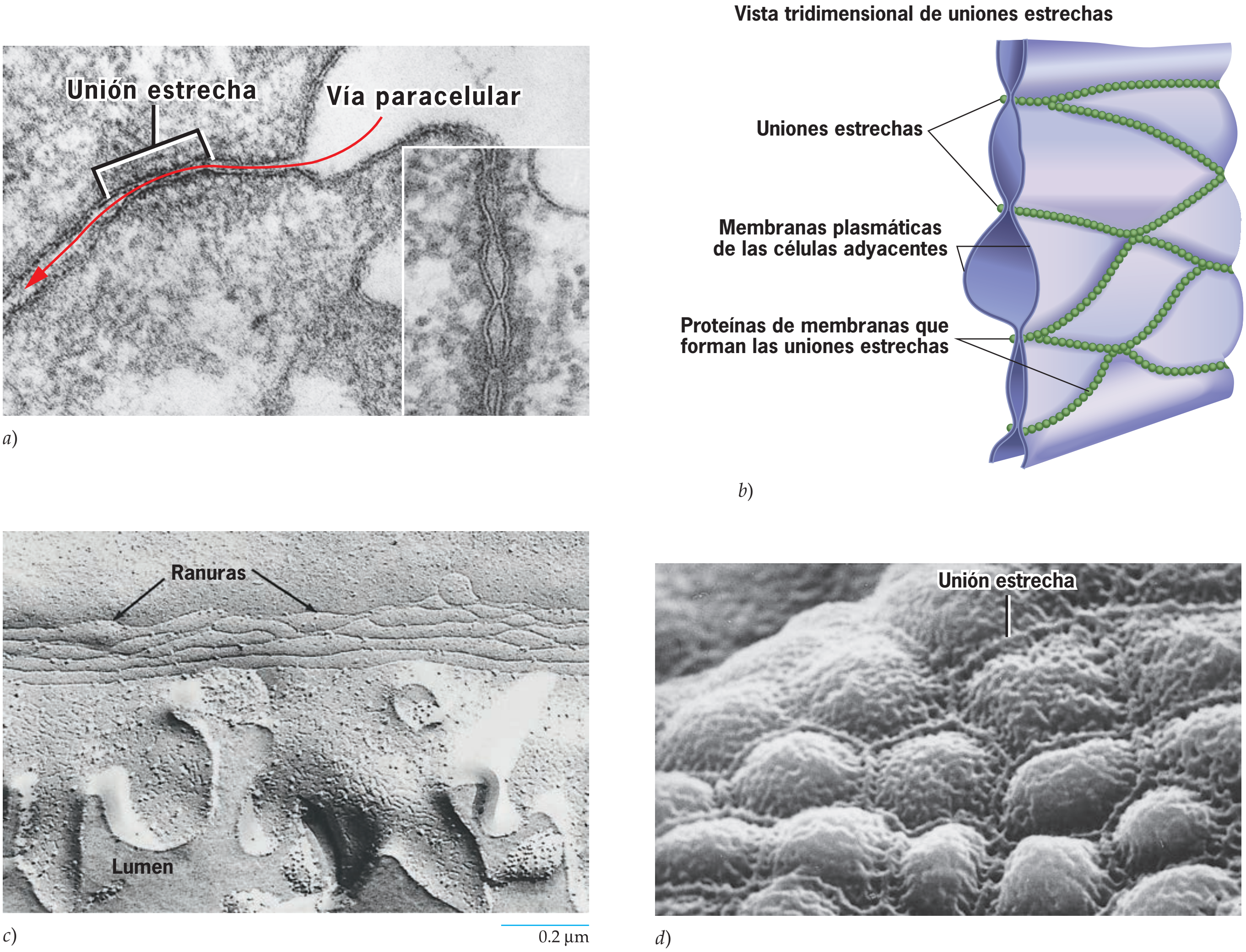



**FIGURA 7-27 Uniones estrechas**. *a*) Micrografía electrónica de una sección a través de la región apical de las células epiteliales adyacentes, que muestra dónde las membranas plasmáticas de las dos células se unen en puntos intermitentes dentro de la unión estrecha. En el recuadro se muestra la estructura de unión estrecha con mayor ampliación. Las uniones estrechas bloquean la difusión de solutos a través de la vía paracelular entre las células. *b*) Un modelo de una unión estrecha que muestra los puntos de contacto intermitentes entre las proteínas integrales de dos membranas opuestas. Cada uno de estos sitios de contacto se extiende como una fila de proteínas emparejadas dentro de las membranas, que forman una barrera que impide que los solutos penetren en el espacio entre las células. *c*) Réplica de fractura por congelación que muestra la cara E de la membrana plasmática de una de las células en una región de una unión estrecha. Las ranuras en la cara E se quedan después de que las proteínas integrales de la membrana se extraen de esta mitad de la membrana. *d*) Micrografía electrónica de barrido de la superficie apical de un epitelio que muestra la naturaleza circundante de las uniones estrechas.

FUENTE: *a*) Cortesía de Daniel S. Friend, Harvard Medical School; *b*) cortesía de Hiroyuki Sasaki y Shoichiro Tsukita; *c*) de Philippa Claude y Daniel A. Goodenough. *J Cell Biol* 1973;58:390, fig. 6. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *d*) cortesía de D. Tarin.

dos **uniones estrechas** (o *zonulae occludens*), entre las células epiteliales vecinas. Las uniones estrechas (TJ, *tight junctions*) están ubicadas en el extremo más apical del complejo de unión entre las células epiteliales adyacentes (véase figura 7-24). En la figura 7-27*a*) se muestra una micrografía electrónica de una sección a través de una TJ que se ha cortado para incluir las membranas plasmáticas de las células adyacentes. En una vista de mayor ampliación se muestra la interacción entre las membranas de una TJ que se detallan en el recuadro de la figura 7-27*a*). Es evidente que las membranas contiguas hacen contacto en puntos intermitentes, en lugar de fusionarse en un área de superficie grande. Como se indica en la figura 7-27*b*), los puntos de contacto célula-célula son sitios donde las proteínas integrales de dos membranas adyacentes se encuentran dentro del espacio extracelular.

La fractura por congelación, que permite la observación de las caras internas de una membrana (véase figura 4-15), muestra que las membranas plasmáticas de una TJ contienen hebras interconectadas (véase figura 7-27*c*) que corren, en su mayoría, paralelas entre sí y a la superficie apical del epitelio. Las hebras (o ranuras en la cara opuesta de una membrana fracturada) corresponden a filas emparejadas de proteínas de membrana integrales alineadas que se ilustran en el recuadro de la figura 7-27*b*). Las proteínas integrales de las TJ forman fibrillas continuas que circundan por completo la célula como una burbuja y hacen contacto con las células vecinas en todos los lados (véase figura 7-27*d*). Como resultado, las TJ sirven como una barrera para la difusión libre de agua y solutos desde el compartimiento extracelular de un lado de una lámina epitelial al del otro lado. Las uniones estrechas también sirven como "barrera" que ayudan a mantener el carácter polarizado de las células epiteliales (véase figura 4-30). Lo logran al bloquear la difusión de proteínas integrales entre el dominio apical de la membrana plasmática y sus

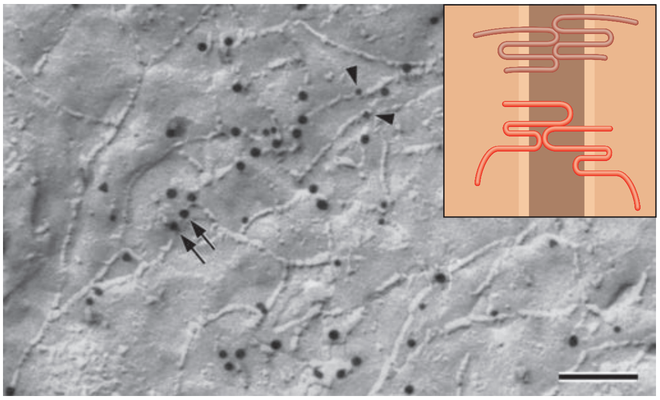


**FIGURA 7-28 Composición molecular de las cadenas de uniones estrechas.** Micrografía electrónica de una réplica por fractura y congelación de células que se habían unido entre sí mediante uniones estrechas. Las caras de fractura se incubaron con dos tipos de anticuerpos marcados en oro. Las partículas de oro más pequeñas (puntas de flecha) revelan la presencia de moléculas de claudina, mientras que las partículas de oro más grandes (flechas) indican la presencia de ocludina. Estos experimentos demuestran que ambas proteínas están presentes en las mismas cadenas de unión estrecha. La barra es igual a 0.15 μm. En el recuadro se muestra una posible disposición de las dos proteínas integrales de membrana a medida que hacen contacto en el espacio intercelular. Tanto las claudinas (rojo) como la ocludina (marrón) abarcan cuatro veces la membrana.

FUENTE: Micrografía de Mikio Furuse, Hiroyuki Sasaki, Kazushi Fujimoto, *et al. J Cell Biology* 1998;143:398, fig. 6; reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

dominios laterales y basales. Al igual que otros sitios de adhesión celular, las uniones estrechas también están involucradas en las vías de señalización que regulan numerosos procesos celulares.

No todas las TJ exhiben las mismas propiedades de permeabilidad. Parte de la explicación puede observarse bajo el microscopio electrónico: las TJ con varios filamentos paralelos (como el de la figura 7-27*c*) tienden a formar mejores cierres que las uniones con solo uno o un par de filamentos. Pero en la historia hay más que números de filamentos. Algunas TJ son permeables a iones *específicos* o solutos que son impermeables para otras TJ. Los estudios de la última década han arrojado una luz considerable sobre las bases moleculares de la permeabilidad de las TJ.

Originalmente se pensó que las hebras de TJ estaban compuestas de una sola proteína, la *ocludina*. Luego, se descubrió que las células cultivadas que carecían de un gen para la ocludina aún podían formar hebras de TJ de estructura y función normales. Estudios posteriores de Shoichiro Tsukita y sus colegas en la Universidad de Kioto condujeron al descubrimiento de una familia de proteínas llamadas *claudinas* que forman el principal componente estructural de las hebras de la TJ. La micrografía electrónica de la **FIGURA 7-28** muestra que la ocludina y la claudina están presentes juntas dentro de las fibrillas lineales de una TJ. Se han identificado al menos 24 claudinas distintas; las diferencias en la distribución de estas proteínas pueden explicar las distinciones selectivas en la permeabilidad de la TJ. Por ejemplo, una pequeña región de un túbulo renal humano, una región conocida como rama ascendente gruesa (TAL, *thick ascending limb*), tiene unas TJ que son permeables a los iones de magnesio ($Mg^{2+}$). Se cree que los bucles de las moléculas de claudina que se extienden en el espacio extracelular forman poros en la TAL que son selectivamente permeables a los iones de $Mg^{2+}$. El apoyo para este concepto proviene de la investigación de un miembro específico de la familia claudina, la claudina 16, que se expresa principalmente en la TAL. La importancia de claudina 16 en la función renal se reveló en estudios de pacientes que padecen una enfermedad rara caracterizada por niveles anormalmente bajos de $Mg^{2+}$ en la sangre. Se encontró que estos pacientes tenían mutaciones en ambas copias de su gen *claudina 16*. El nivel de $Mg^{2+}$ en su sangre es bajo porque las uniones estrechas que contienen la claudina anormal son impermeables al $Mg^{2+}$. Como resultado, este importante ion no puede ser reabsorbido del túbulo y simplemente se excreta en la orina.

Otra función importante de las uniones estrechas salió a la luz en 2002. Se pensó durante décadas que la impermeabilidad de la piel de los mamíferos al agua era únicamente una propiedad de la capa exterior cornificada de la piel (véase figura 7-1), que contiene filamentos proteicos fuertemente empaquetados y lípidos asociados. Se descubrió, sin embargo, que los ratones que carecían de un gen para la claudina murieron poco después del nacimiento como resultado de la deshidratación. La investigación adicional reveló que las células en una de las capas externas de la epidermis *normal* están conectadas entre sí por uniones estrechas. Los animales que carecían del gen para claudina 1 no pudieron ensamblar uniones herméticas epidérmicas y, como resultado, sufrieron pérdida incontrolada de agua.

También existen uniones estrechas entre las células endoteliales que recubren las paredes de los capilares. Estas uniones son particularmente evidentes en el cerebro, donde ayudan a formar la *barrera hematoencefálica*, que impide que las sustancias pasen del torrente sanguíneo al cerebro. Aunque los iones pequeños e incluso las moléculas de agua pueden no ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, las células del sistema inmune pueden atravesar el endotelio por estas uniones. Se cree que estas células envían una señal que abre la unión, lo que permite que las células pasen. Al tiempo que protege el cerebro de solutos no deseados, la barrera hematoencefálica también impide el acceso de muchos fármacos al sistema nervioso central. Como consecuencia, un objetivo principal de la industria farmacéutica es desarrollar medicamentos que abran temporalmente las uniones estrechas del cerebro para permitir el paso de compuestos terapéuticos.

**REPASO**

1. ¿Qué le indica el análisis de fractura por congelación sobre la estructura de una unión que no se puede aprender del examen de las secciones de tejido teñidas?
2. ¿Cómo contribuye la estructura de una unión estrecha a su función?

## 7.12 Uniones gap y plasmodesmos: mediación de la comunicación intercelular

Las uniones gap y los plasmodesmos son sitios especializados de comunicación entre células adyacentes en animales y plantas, respectivamente. Las membranas plasmáticas de una unión gap contienen canales que conectan el citoplasma de una célula con el citoplasma de la célula adyacente. El paso de corrientes iónicas a través de uniones gap desempeña una función fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Los plasmodesmos son canales citoplásmicos entre células adyacentes de plantas que permiten el libre paso de moléculas de soluto.

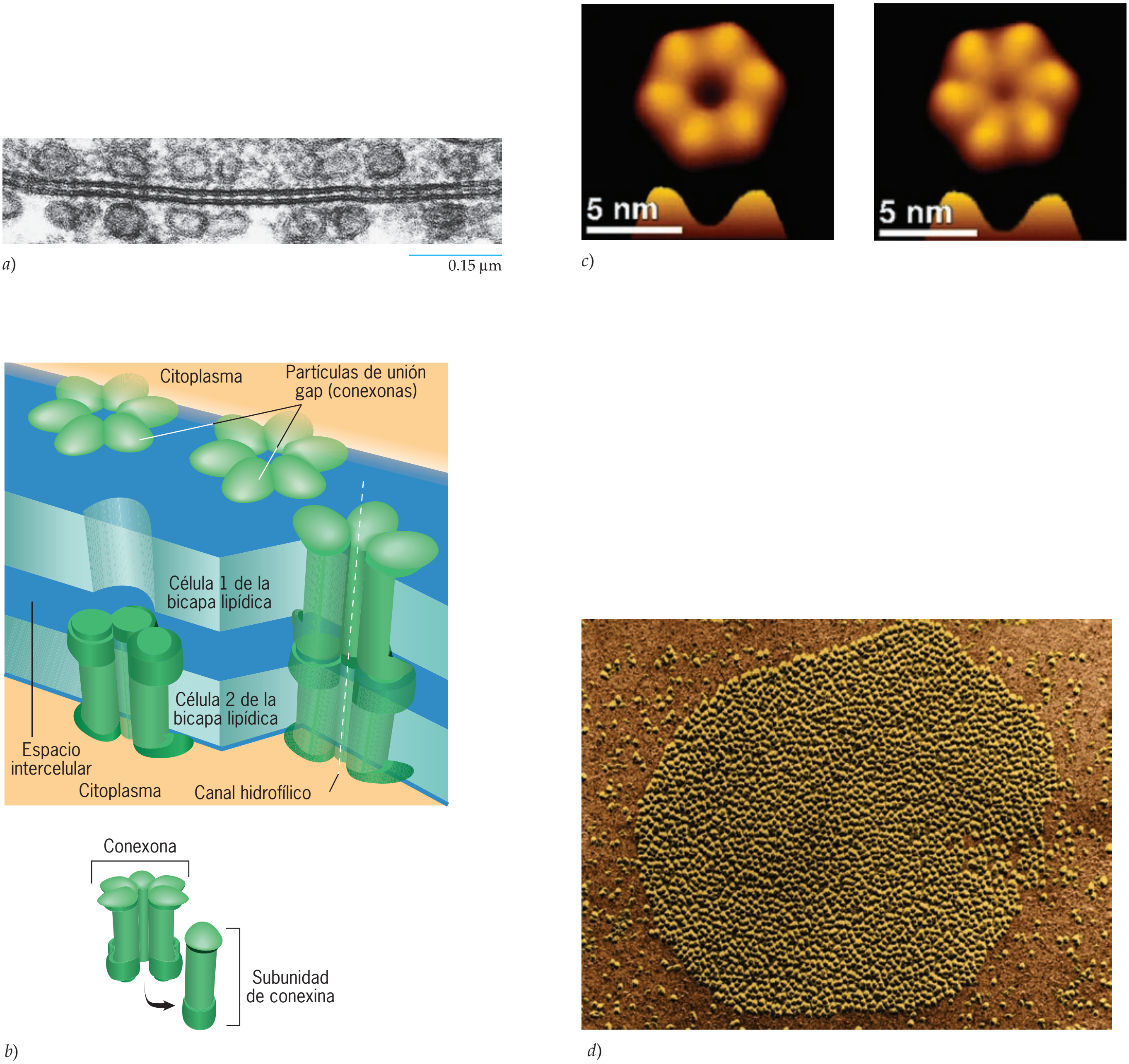



**FIGURA 7-29 Uniones gap**. *a*) Micrografía electrónica de una sección a través de una unión gap perpendicular al plano de las dos membranas adyacentes. Los "conductos" entre las dos células se ven como perlas densas de electrón en las membranas plasmáticas expuestas. *b*) Modelo esquemático de una unión gap que muestra la disposición de seis subunidades de conexina para formar una conexona, que contiene la mitad del canal que conecta el citoplasma de las dos células adyacentes. Cada subunidad de conexina es una proteína integral con cuatro dominios transmembrana. *c*) Imágenes de alta resolución derivadas de microscopía de fuerza atómica de la superficie extracelular de un único conector en la conformación abierta (izquierda) y cerrada (derecha). El cierre de la conexona fue inducido por la exposición a una concentración elevada de iones $Ca^{2+}$. *d*) Réplica de fractura por congelación de una placa de unión gap que muestra la gran cantidad de conexonas y su alta concentración. (La estructura cristalina de una unión gap se puede encontrar en *Nature* 2009;458:597).

FUENTE: *a*) De Camillo Peracchia y Angela F. Dulhunty. *J Cell Biol* 1976;70:419, fig. 5. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *c*) cortesía de Gina E. Sosinsky. De *J Cell Science* 2003;116:4479; con permiso de The Company of Biologists, Ltd. http://jcs.biologists.org/content/116/22/4479.full?sid=43a03f80-6c77-4b57-ad32-7d6e8884a69e; *d*) Don W. Fawcett/Science Source Images.

## Uniones gap

Las **uniones gap** son sitios entre las células animales que están especializados para la comunicación intercelular. Las micrografías electrónicas revelan que las uniones gap son sitios en los que las membranas plasmáticas de las células adyacentes se acercan una a la otra (dentro de aproximadamente 3 nm), pero no hacen contacto directo. En cambio, la hendidura entre las células está atravesada por hebras muy finas (véase **FIGURA 7-29*a***) que en realidad son "conductos" moleculares que pasan a través de las membranas plasmáticas adyacentes y se abren hacia el citoplasma de las células adyacentes (véase figura 7-29*b*).

Las uniones gap tienen una composición molecular simple; están compuestas completamente por una proteína de membrana

integral llamada *conexina*. Las conexinas están organizadas en complejos multisubunidad, denominados **conexonas**, que cubren completamente la membrana (véase figura 7-29*b*). Cada conexona se compone de seis subunidades de conexinas dispuestas en un anillo alrededor de una abertura central, o *annulus*, que tiene aproximadamente 1.5 nm de diámetro en su superficie extracelular [véase figura 7-29*c*), izquierda].

Durante la formación de las uniones gap, las conexonas en la membrana plasmática de las células, se unen estrechamente a través de extensas interacciones no covalentes de los dominios extracelulares de las subunidades de conexina. Una vez alineados, las conexonas en las membranas plasmáticas adyacentes forman canales intercelulares completos que conectan el citoplasma de una célula con el citoplasma de su vecina (véase figura 7-29*b*). Un gran número de conexonas se agrupan en regiones específicas de la membrana y forman placas de unión gap que pueden visualizarse cuando la membrana se divide en el medio por la fractura por congelación [véase figura 7-29d) y **video experimental tutorial: Microscopía electrónica por fractura y congelación** para este capítulo].

Como se discutió en las "Vías experimentales" (véase sección 7.13), las uniones gap son sitios de comunicación entre los citoplasmas de las células adyacentes. La existencia de comunicación intercelular de las uniones gap (GJIC, *gap-junction intercelular communication*) se revela a través del paso de corrientes iónicas o tintes de bajo peso molecular, como la fluoresceína, de una célula a sus vecinas (véase **FIGURA 7-30**). Las uniones gap de los mamíferos permiten la difusión de moléculas que tienen una masa molecular por debajo de aproximadamente 1 000 daltones. A diferencia de los canales iónicos altamente selectivos que conectan una célula con el medio externo (véase sección 4.11), los canales de unión gap son relativamente no selectivos. Del mismo modo que los canales iónicos pueden abrirse o cerrarse, los canales de unión gap también están cerrados. Una serie de estímulos, incluida la fosforilación de las subunidades de conexina, y los cambios de voltaje a través de la unión [véase figura 7-29*c*), derecha] puede desencadenar el cierre del canal.

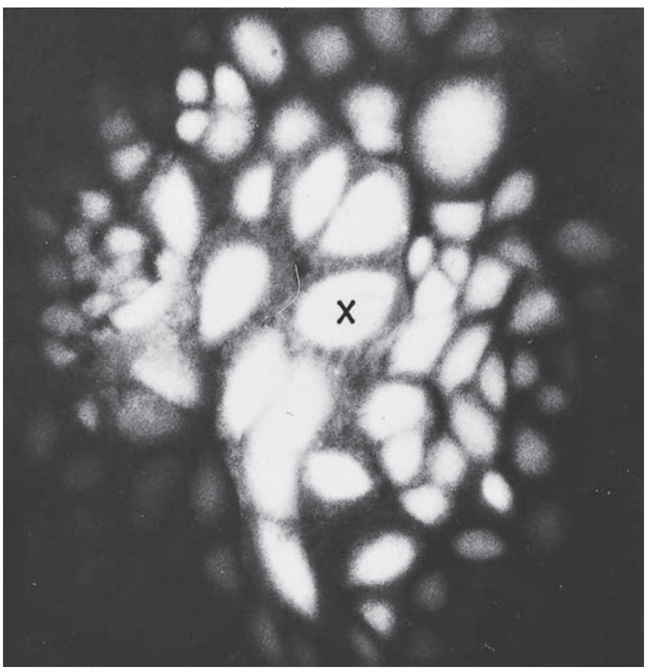



**FIGURA 7-30 Resultados de un experimento que demuestra el paso de solutos de bajo peso molecular a través de las uniones gap.** Micrografía que muestra el paso de la fluoresceína de una célula en la que se inyectó (X) a las células circundantes.

FUENTE: De R. Azarnia y W. R. Loewenstein. *J Memb Biol* 1971;6:378. Reproducida con permiso de Springer Science y Business Media.

En el capítulo 4 se observó cómo las sustancias químicas liberadas desde las puntas de las células nerviosas cercanas estimulan las células del músculo esquelético. La estimulación de una célula del músculo cardiaco o liso se produce por un proceso muy diferente, uno que involucra las uniones gap. La contracción del corazón de los mamíferos es estimulada por un impulso eléctrico generado en una pequeña región del músculo cardiaco especializado llamado *nodo sinoauricular*, que actúa como marcapaso del corazón. El impulso se propaga con rapidez a medida que una corriente de iones fluye a través de las uniones gap de una célula del músculo cardiaco a sus vecinas, lo cual provoca que las células se contraigan en sincronía. Del mismo modo, el flujo de iones a través de las uniones gap que interconectan las células del músculo liso en la pared del esófago o el intestino conduce a la generación de ondas peristálticas coordinadas que se mueven a lo largo de la pared.[2]

Las uniones gap pueden colocar un gran número de células de un tejido en contacto citoplásmico íntimo. Esto tiene importantes consecuencias fisiológicas debido a que una cantidad de sustancias reguladoras altamente activas, como el AMP cíclico y los fosfatos de inositol (véase capítulo 15), son lo suficientemente pequeñas como para caber a través de los canales de uniones gap. Como resultado, las uniones gap tienen el potencial de integrar las actividades de las células individuales de un tejido en una unidad funcional. Si, por ejemplo, una hormona estimula solo unas pocas células cercanas a un vaso sanguíneo particular, el estímulo puede transmitirse rápidamente a todas las células del tejido. Las uniones gap también permiten a las células cooperar de forma metabólica al compartir metabolitos clave, como ATP, fosfatos de azúcar, aminoácidos y muchas coenzimas, que son lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de estos canales intercelulares. Esto es particularmente importante en tejidos como las lentes, que son avasculares (es decir, carecen de vasos sanguíneos).

Las conexinas (Cx, *conexin*), las proteínas de las cuales se construyen las uniones gap, son miembros de una familia multigénica. Se han identificado aproximadamente 20 conexinas diferentes con distintas distribuciones específicas de tejidos. Las conexonas compuestas de diferentes conexinas exhiben marcadas diferencias en la conductancia, la permeabilidad y la regulación. En algunos casos, las conexonas en células vecinas que se componen de conexinas diferentes son capaces de acoplarse y formar canales funcionales, mientras que en otros casos, no lo son. Estas diferencias de compatibilidad pueden desempeñar una función importante en la promoción o prevención de la comunicación entre diferentes tipos de células en un órgano. Por ejemplo, las conexonas que unen las células del músculo cardiaco se componen de la conexina Cx43, mientras que las conexonas que unen las células que componen el sistema de conducción eléctrico del corazón disponen de Cx40. Debido a que estas dos conexinas forman conexiones incompatibles, los dos tipos de células están aisladas de manera eléctrica entre sí a pesar de estar en contacto físico. Varios trastornos hereditarios se han asociado con mutaciones en genes que codifican conexinas. Las consecuencias de estos trastornos incluyen sordera, ceguera, arritmias cardiacas, anormalidades de la piel o degeneración nerviosa.

En los últimos años se ha descubierto un nuevo tipo de sistema de comunicación que consiste en túbulos delgados, muy alargados, capaces de conducir proteínas de la superficie de las célu-

[2] Como se discutió en las "Vías experimentales", las uniones gap también ocurren entre las membranas presinápticas y postsinápticas de las células nerviosas adyacentes en ciertas partes del cerebro, lo que permite que los impulsos nerviosos se transmitan de forma directa de una neurona a otra sin requerir la liberación de transmisores químicos.

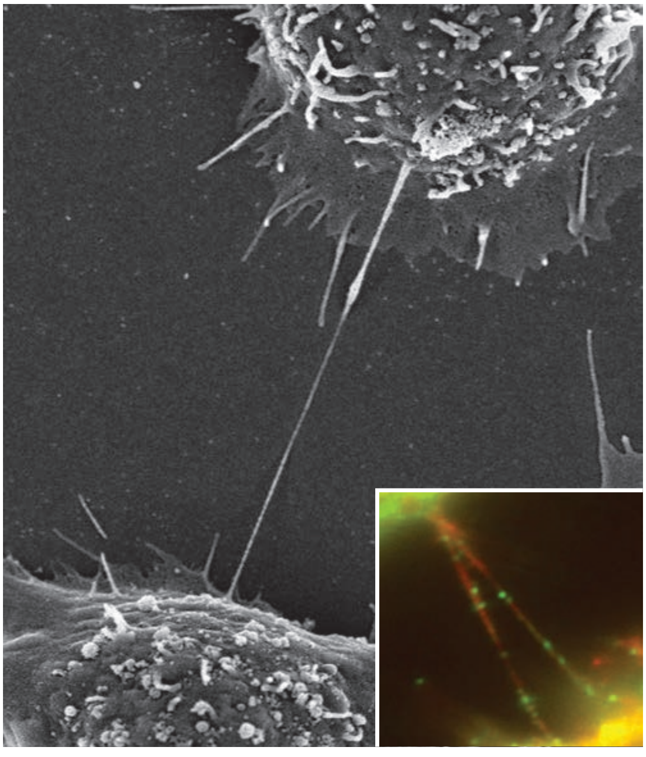


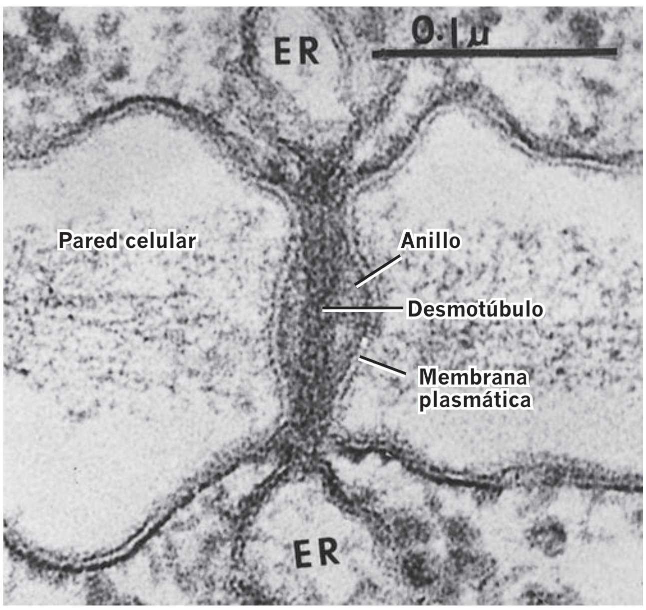

**FIGURA 7-31** Túneles de nanotubos. Micrografía electrónica de barrido que muestra dos células neuroendocrinas cultivadas conectadas entre sí mediante un proceso tubular delgado capaz de transportar materiales entre el citoplasma de las células vecinas. Estos procesos, que tienen solo alrededor de 100 nm de diámetro, están soportados por un "esqueleto" de actina interna. El recuadro muestra una cantidad de vesículas marcadas de manera fluorescente capturadas en el acto de movimiento entre dos células.

FUENTE: De Amin Rustom, *et al. Science* 2004;303:1007; © 2004, reimpresa con permiso de AAAS. Imagen cortesía de Hans-Hermann Gerdes.

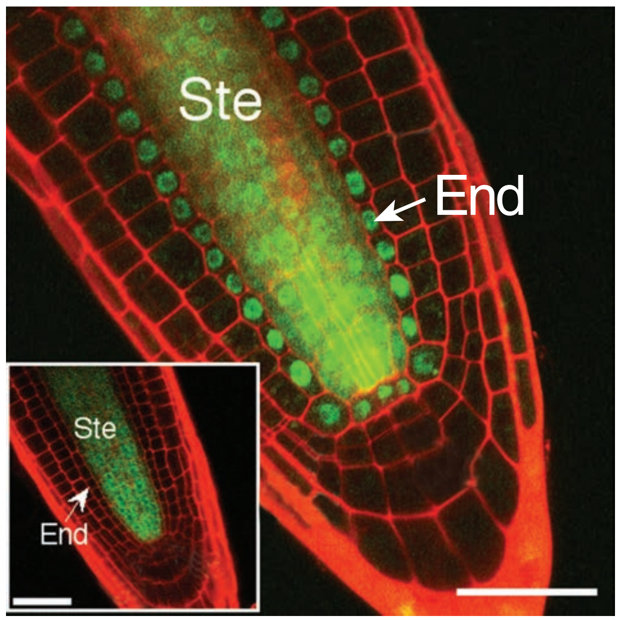
las, vesículas citoplasmáticas, orgánulos y señales de calcio de una célula a otra a largas distancias. También pueden transmitir partículas víricas infecciosas y priones entre las células. Hasta la fecha, estos *túneles de nanotubos*, como se les conoce, se han estudiado principalmente en células cultivadas (como en la **FIGURA 7-31**), pero la creciente evidencia sugiere que pueden desempeñar una función en diversos procesos de desarrollo en una variedad de organismos modelo. Sin embargo, actualmente no se conoce bien cómo se forman y se regulan los túneles de nanotubos.

## Plasmodesmos

A diferencia de los animales, cuyas células tienen un contacto íntimo entre sí, las células vegetales se separan una de otra por una barrera sustancial: la pared celular. No es sorprendente, por tanto, que las plantas carezcan de las moléculas de adhesión



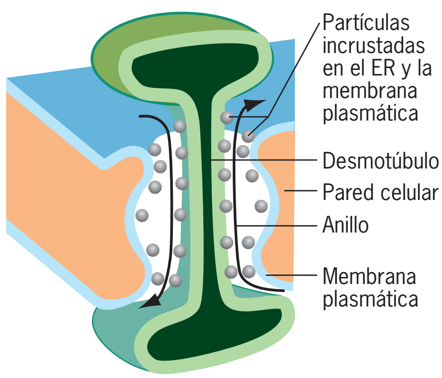

*a*)




*c*)

**FIGURA 7-32 Plasmodesmo.** *a*) Micrografía electrónica de una sección a través de un plasmodesmo de un gametofito de helecho. Se considera que el desmotúbulo consiste en una membrana que es continua con el retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*) del citoplasma en ambos lados de la membrana plasmática. *b*) Dibujo esquemático de un plasmodesmo. Las flechas negras indican las vías que toman las moléculas a medida que pasan a través del anillo de una célula a otra. *c*) Un ejemplo del movimiento de una proteína de una célula a otra dentro de una raíz de planta. En el recuadro más pequeño se muestra la localización de las moléculas de RNA mensajero marcadas de forma fluorescente (verde) que codifican una proteína llamada Shr. El mRNA se localiza dentro de las células de la estela (Ste, *stele*), que es así el tejido en el que se sintetiza esta proteína. En la foto más grande se muestra la localización de la proteína Shr marcada de forma fluorescente (también verde), que está presente tanto dentro de las células estelares donde se sintetiza y las células endodérmicas (End, *endodermal*) contiguas en las que ha pasado a través de los plasmodesmos conectados. La proteína transportada se localiza dentro de los núcleos de las células endodérmicas donde actúa como un factor de transcripción. Barras: 50 mm y 25 µm (recuadro).

FUENTE: *a*) De Lewis G. Tilney, Todd J. Cooke, Patricia S. Connelly, *et al. J Cell Biol* 1991;112:740, fig. 1a; reproducida con permiso de la Rockefeller University Press; *b*) de Keiji Nakajima, *et al. Nature* 2001;413:308; © 2001, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers, Ltd. Imagen cortesía de Philip N. Benfey.




*b*)

celular que se han discutido en este capítulo. Aunque las plantas carecen de las uniones especializadas que se encuentran en los tejidos animales, la mayoría de las células vegetales están conectadas entre sí por los plasmodesmos. Los **plasmodesmos** (en singular, **plasmodesmo**) son canales citoplasmáticos que pasan a través de las paredes celulares de las células adyacentes. En la figura 7-32*a*), *b*) se muestra un plasmodesmo simple (es decir, no ramificado). Los plasmodesmos están revestidos por una membrana plasmática y con frecuencia contienen una estructura central densa, el *desmotúbulo*, derivado del retículo endoplásmico liso de las dos células. Al igual que las uniones gap entre las células animales, los plasmodesmos sirven como sitios de comunicación célula a célula, a medida que las sustancias pasan a través del anillo que rodea al desmotúbulo.

Durante muchos años se pensó que los plasmodesmos eran impermeables a moléculas superiores a aproximadamente 1 000 daltones (1 kDa). Esta conclusión se basó en estudios en los que se inyectaron tintes fluorescentes de diferente tamaño en las células. Estudios más recientes sugieren que los plasmodesmos permiten que pasen moléculas mucho más grandes (hasta 50 kDa) entre las células, debido al hecho de que el poro de los plasmodesmos es capaz de dilatarse. La primera idea de esta propiedad dinámica se obtuvo de los estudios realizados en la década de 1980 sobre los virus de plantas que se propagan de una célula a otra a través de los plasmodesmos. Se descubrió que los virus codificaban una *proteína de movimiento* que interactuaba con la pared del plasmodesmo y aumentaba el diámetro del poro.

Estudios posteriores revelaron que las células vegetales producen sus propias proteínas de movimiento que regulan el flujo de proteínas y los RNA de una célula a otra. Algunas de estas macromoléculas encuentran su camino en el sistema vascular, donde integran actividades en toda la planta, como el crecimiento de hojas y flores nuevas, o la defensa contra los patógenos. En la **FIGURA 7-32c)** se documenta el movimiento de una proteína (marcada con fluorescencia verde) de un tipo de tejido vegetal (la estela), donde se sintetizó, a un tejido adyacente (la endodermis). Se observa que la proteína se concentra en los núcleos esféricos de la capa única de células endodérmicas donde actúa para estimular la transcripción génica.

**REPASO**

1. Compare la disposición de las proteínas integrales de membrana en una unión estrecha *versus* una unión gap.
2. ¿En qué son similares los plasmodesmos y las uniones gap? ¿En qué consisten sus diferencias? ¿Esperaría que una proteína de tamaño moderado pasara a través de un plasmodesmo?

# 7.13 VÍAS EXPERIMENTALES

## Función de las uniones gap en la comunicación intercelular

Con base en la información presentada en el capítulo 4, se puede suponer que la transmisión sináptica siempre ocurre por el movimiento de moléculas de neurotransmisores desde la neurona presináptica a la célula postsináptica. Esta fue la opinión que predominó hasta la década de 1950, cuando Edwin Furshpan y David Potter del University College de Londres encontraron una notable excepción. Furshpan y Potter estaban estudiando la transmisión sináptica entre las neuronas gigantes en el cordón nervioso del cangrejo de río. Observaron que una despolarización *subumbral* pequeña inducida en la célula nerviosa presináptica producía una despolarización muy rápida (0.1 ms) en la célula postsináptica.[1,2] Si las células nerviosas se habían conectado mediante una sinapsis química, un cambio por debajo del umbral en el potencial de membrana no debería haberse propagado a la célula postsináptica, porque no sería suficiente estimular la liberación de moléculas de los neurotransmisores. Incluso si se liberaran moléculas de neurotransmisores, posiblemente no podrían inducir un cambio tan rápido en la célula postsináptica. Furshpan y Potter llegaron a la conclusión de que las dos células nerviosas estaban conectadas por un tipo diferente de sinapsis, una *sinapsis electrotónica*, en la cual las corrientes iónicas en la célula presináptica podían fluir de manera directa a la célula postsináptica en el otro lado de la sinapsis. Se suponía que este tipo de conexión célula-célula, que permite el flujo de iones entre las células, era peculiar de las células excitables, como las neuronas, que están especializadas en la comunicación célula-célula.

Durante la década de 1960, Yoshinobu Kanno y Werner Loewenstein de la Universidad de Columbia estudiaron las propiedades de permeabilidad de la envoltura nuclear, el complejo membranoso que limita el núcleo. Para determinar si los iones eran capaces de fluir a través de la envoltura nuclear, recurrieron a las células muy grandes que componen los tejidos epiteliales de la larva de la fruta (células que contienen los cromosomas gigantes que habían demostrado ser tan útiles para los genetistas). Estas células eran lo suficientemente grandes como para permitir la penetración de los microelectrodos capaces de inducir y registrar las corrientes iónicas (**FIGURA 1**). Para su sorpresa, Kanno y Loewenstein descubrieron que cuando se inyectaban iones en el núcleo de una célula, no solo el flujo de iones (medido como una corriente eléctrica) se propagaba al citoplasma de esa célula, sino que fluía de forma directa al citoplasma de una célula adyacente. De hecho, el potencial registrado en la célula adyacente era casi tan grande como el de la célula en la que se indujo originalmente la corriente. Kanno y Loewenstein concluyeron que las células epiteliales que componen la glándula salival están *eléctricamente* acopladas entre sí, lo que significa que los iones pueden fluir libremente de una célula a otra a través de las uniones celulares de baja resistencia.[3] Si los iones inorgánicos pequeños pudieran pasar a través de estas uniones entre las células vecinas, ¿qué pasa con las sustancias más grandes? Cuando se inyectó un pequeño volumen del ion fluorescente



**FIGURA 1** Micrografía que muestra la inserción de microelectrodos en las células vivas del túbulo de Malpighi de la célula de un insecto.
FUENTE: Cortesía de Werner R. Loewenstein.

(*continúa*)

fluoresceína (peso molecular de 376 daltones) en el citoplasma de una célula con una micropipeta, la fluorescencia se diseminó con rapidez hacia las células adyacentes hasta que toda la capa epitelial brilló desde la presencia del marcador (como en la figura 7-31). Por el contrario, nada del colorante fluorescente se filtró fuera de las células en el medio externo, lo que indica que las moléculas de fluoresceína se difunden de manera directa del citoplasma de una célula al citoplasma de las células adyacentes por medio de contactos permeables célula-célula.[4] Pronto se hicieron observaciones similares sobre una variedad de tipos diferentes de células epiteliales y mesenquimales, incluidas las de varios mamíferos, lo que indica que estas uniones comunicantes están muy extendidas.

Los estudios con microscopía electrónica han demostrado que las células animales están limitadas por una membrana plasmática continua. Estos nuevos datos sugirieron que la estructura de esta membrana a veces se modificó en sitios donde las células hicieron contacto con otras células. De lo contrario, sería imposible que las sustancias se movieran de forma directa del citoplasma de una célula a otra. El descubrimiento de uniones celulares que contienen canales entre células estrechamente aplicadas fue realizado en 1967 por Jean Paul Revel y M. J. Karnovsky.[5] Las micrografías electrónicas de estas uniones mostraron una hendidura distinta entre las células adyacentes, lo que llevó a los investigadores a denominarlas "uniones gap" para distinguirlas de las uniones estrechas, donde las células adyacentes establecen contacto directo.

Se llevaron a cabo estudios para aprender más sobre el tamaño de los canales que conectan los citoplasmas de las células adyacentes. El laboratorio de Loewenstein probó sondas fluorescentes que estaban relacionadas con péptidos de diferentes tamaños. Descubrieron que las moléculas de hasta 1 200 daltones podían difundir larvas de insectos entre las células de las glándulas salivales.[6] Según estimados de las dimensiones de estas moléculas, concluyeron que el diámetro efectivo del canal era de aproximadamente 10 a 15 Å (1.0 a 1.5 nm), un valor que coincidía estrechamente con el estimado a partir de micrografías de alta resolución de las uniones gap tomadas con el microscopio electrónico.[7]

Una de las primeras preguntas consideradas por Kanno y Loewenstein después de su descubrimiento de los contactos intercelulares permeables fue si estos mismos tipos de contactos estaban presentes en las células cancerosas. Se sabe que las tasas de crecimiento de las células normales se ven influidas por estímulos de su entorno. Es posible que uno de los factores que permitió a las células cancerosas escapar de los tipos de mecanismos de control del crecimiento que prevalecen en las células normales fue la pérdida de su capacidad de recibir moléculas reguladoras de las células vecinas. Kanno y Loewenstein investigaron esta posibilidad midiendo el flujo de corriente iónica en el tejido hepático normal en comparación con el de una variedad de tumores hepáticos. Mientras que la corriente iónica fluía fácilmente entre las células normales de un hígado de rata, no se pudo detectar el paso de corriente entre las células de ninguno de los tumores hepáticos que se estudiaron.[8] Desde estas investigaciones iniciales, se han analizado cientos de tipos diferentes de células cancerosas por su capacidad para llevar a cabo la comunicación intercelular de unión gap (GJIC). Se ha encontrado que los resultados iniciales de Loewenstein y Kanno son ciertos para la mayoría, pero no para todas las células cancerosas que se han investigado.[9,10] No es sorprendente que no todas las células cancerosas exhiban las mismas propiedades con respecto a la GJIC. La conversión de una célula normal en una célula maligna es un fenómeno multietapa que puede ocurrir como resultado de cambios en una amplia variedad de genes diferentes (véase capítulo 16). Existen distintos mecanismos por los cuales una célula puede perder el control del crecimiento. Algunos de estos mecanismos parecen implicar la pérdida de la capacidad de las células para transmitir señales a través de uniones gap. Entre los tumores donde ocurre esto, existe a menudo una pérdida

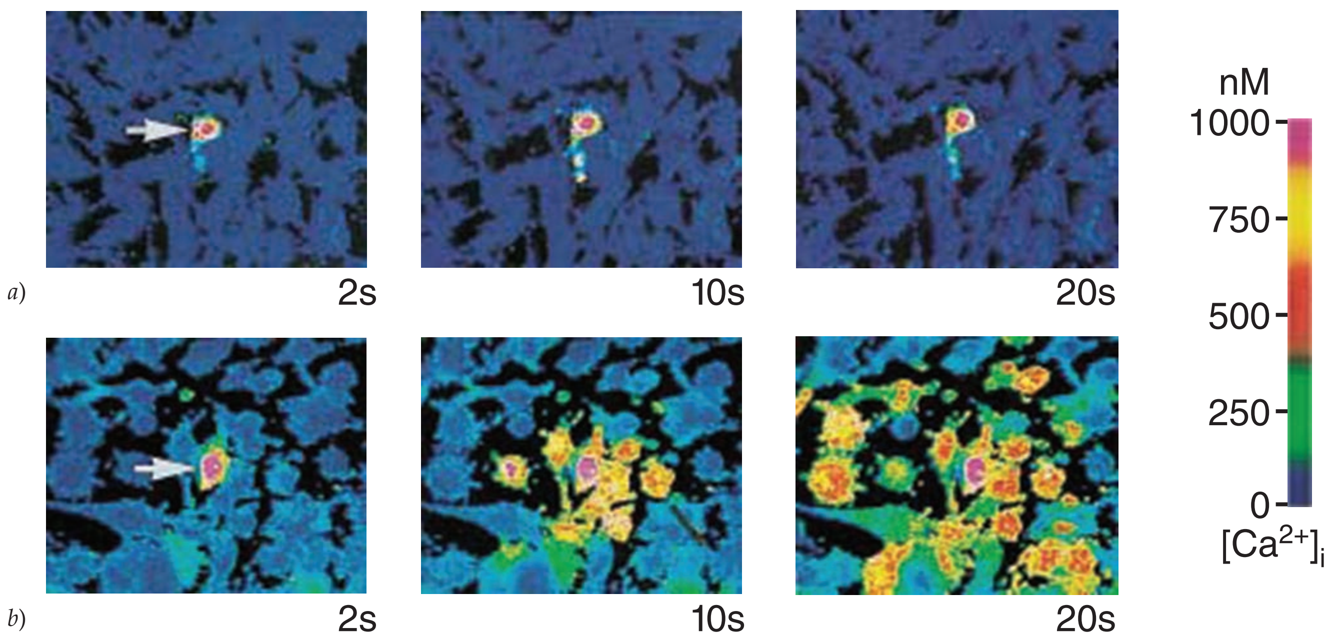



**FIGURA 2** Ondas de calcio inducidas por estimulación mecánica en *a*) un cultivo de control de células de glioma C6 de rata y *b*) un clon de las mismas células mostradas en *a*), pero transfectadas con el DNA de conexina 43. El DNA inyectado se transcribe y traduce en las células transfectadas, y las moléculas de proteína conexina se incorporan a la membrana plasmática. Cuando una de las células no transfectadas se estimula de forma mecánica, hay muy poco paso de $Ca^{2+}$ a sus vecinas. Por el contrario, cuando las células que expresan el gen de conexina se estimulan de manera mecánica, una onda de $Ca^{2+}$ pasa de una célula a otra a través de las uniones gap formadas por la proteína conexina 43.

FUENTE: De Andrew C. Charles, *et al*. *J Cell Biol* 1992;118:197; con permiso de copyright de Rockefeller University Press.

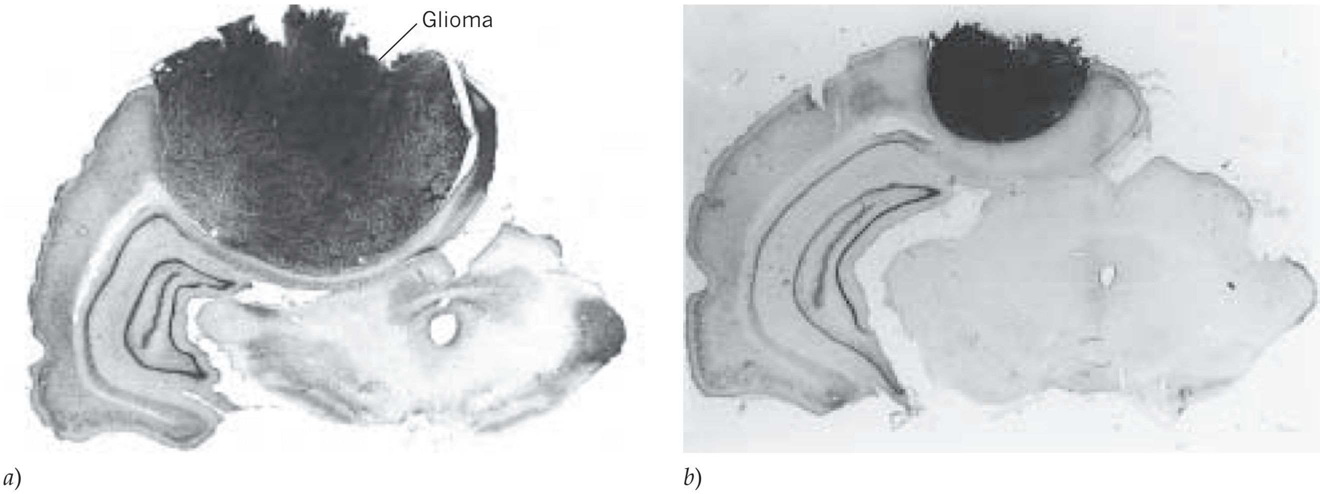



**FIGURA 3** *a*) Cuando se implanta una pequeña masa de células de glioma C6 en el cerebro de una rata, las células se desarrollan en una gran masa tumoral después de dos semanas de crecimiento. *b*) Las mismas células que se han transfectado con el DNA de conexina 43 y se supone que participan en la comunicación intercelular de unión gap se han desarrollado en un tumor mucho más pequeño durante el mismo periodo.

FUENTE: Tomada de Christian C. G. Naus, *et al*. *Cancer Res*. 1992;52:4210.

progresiva en la GJIC a medida que las células se vuelven más y más malignas.[11] Además, puede haber una correlación entre la pérdida de la GJIC y un aumento en el potencial metastásico de una población de células.[12] El potencial metastásico es una propiedad de las células cancerosas que les permite ignorar las células adyacentes y moverse por sí mismas. Se esperaría que dicho comportamiento solo pudiera ocurrir si una célula cortara sus enlaces de comunicación con las células vecinas.

La evidencia obtenida por correlaciones entre una condición (p. ej., pérdida de la GJIC) y otra afección (p. ej., la malignidad) es circunstancial. La mejor evidencia de una relación causal directa entre las dos afecciones ha sido obtenida por Christian Naus y sus colegas de la Universidad de Ontario occidental en estudios en los que las células cancerosas se ven obligadas a expresar proteínas de unión gap (conexinas). Cuando las células de glioma C6 de un tumor cerebral de rata se transfectan con el DNA que codifica la proteína conexina 43, existe un aumento espectacular en la GJIC entre las células tumorales (véase **FIGURA 2**) y una disminución correspondiente en la tasa de crecimiento de las células.[13,14] De forma similar, cuando las células de glioma C6 que se han transfectado con el DNA codificante de la conexina 43 se implantan en los cerebros de ratas adultas, generan tumores mucho más pequeños que las células de glioma no transfectadas (véase **FIGURA 3**).[15] Se han reportado hallazgos similares en células cancerosas humanas.[16,17,18] Por ejemplo, cuando las células del carcinoma de mama humano se transfectan con genes que codifican las conexinas que se expresan en las células mamarias normales, se reduce enormemente la capacidad de las células para formar tumores en ratones susceptibles. Una de las líneas celulares transfectadas exhibió un crecimiento suprimido durante varias semanas y luego mostró un incremento repentino de malignidad. Cuando se analizaron estas células ya no expresaban la proteína conexina, lo que sugiere que el gen transfectado se había perdido o inactivado durante el crecimiento tumoral.[17]

## Referencias


1. Furshpan E. J., Potter DD. Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature* 1957;180:342-343.
2. Furshpan E. J., Potter DD. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol* 1964:145: 289-325.
3. Kanno Y, Loewenstein WR. Low-resistance coupling between gland cells: Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space. *Nature* 1964;201:194-195.
4. Kanno Y, Loewenstein WR. Intercellular diffusion. *Science* 1964;143:959-960.
5. Revel J P, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 1967;33:C7-C12.
6. Simpson I, Rose B, Loewenstein WR. Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 1977;195:294-296.
7. Caspar DLD, *et al*. Gap junction structures: I. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J Cell Biol* 1977;74:605-628.
8. Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: Lack of communication between cancer cells. *Nature* 1966;209:1248–1249.
9. YamasakI H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990;11:1051-1058.
10. Holder JW, Elmore E, Barrett JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res* 1993,53:3475-3485.
11. Klann R, *et al*. Gap-junction intercellular communication in epidermal cell lines from selected stages of SENC mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 1989;49:699-705.
12. Nicolson G. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype. *Cancer Res* 198;747:1473-1487.
13. Charles AC, *et al*. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J. Cell Biol* 1992;118:195-201.
14. Zhu D, *et al*. Transfection of C6 glioma cells with connexin43 cDNA: Analysis of expression, intercellular coupling and cell proliferation. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1991;88:1883-1887.
15. Naus CCG, *et al*. *In vivo* growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Cancer Res* 1992;52:4208-4213.
16. Yamasaki H, Naus CCG. Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 1996;17:1199-1213.
17. Hirschi KK, *et al*. Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiated potential. *Cell Growth Different* 1996;7:861-870.
18. Zhang ZQ, *et al*. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis* 1998;19:1889-1894.

## 7.14 Paredes celulares

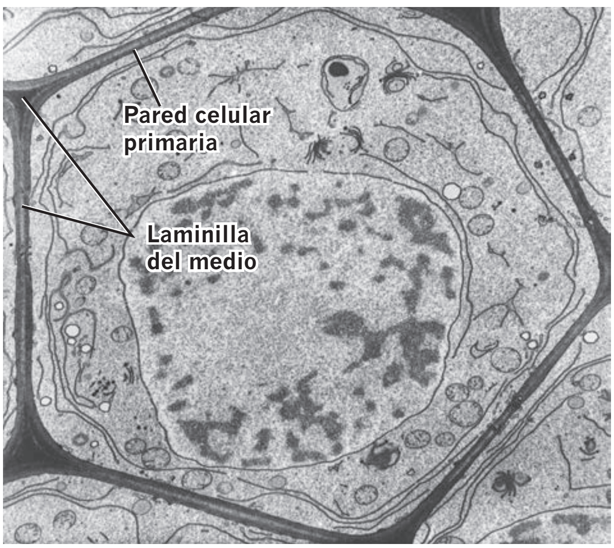


Debido a que se puede esperar que una membrana plasmática de proteína lipídica de menos de 10 nm de espesor ofrezca solo una protección mínima para el contenido de una célula, no es sorprendente que las células "desnudas" sean estructuras extremadamente frágiles. Las células de casi todos los distintos organismos de los animales están encerradas en una cubierta protectora externa. Los protozoos tienen una capa externa engrosada, mientras que las bacterias, los hongos y las plantas tienen **paredes celulares** distintas. Se restringirá la discusión a las paredes celulares de las plantas, que fueron las primeras estructuras celulares que se observaron con un microscopio óptico (página 2).

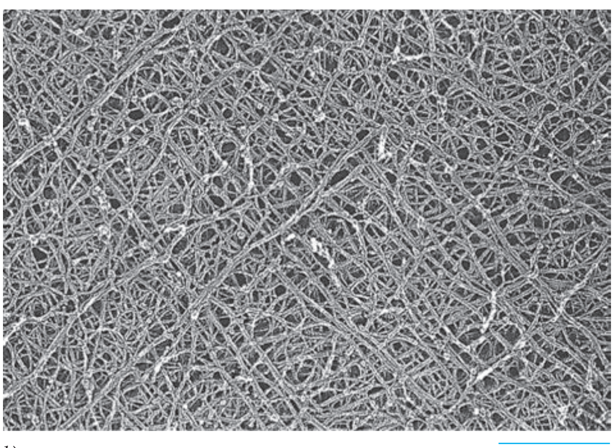
Las paredes celulares de las plantas realizan numerosas funciones vitales. Como se analiza en la figura 4-36, las células vegetales desarrollan una presión de turgencia que empuja contra la pared circundante. Como resultado, la pared confiere a la célula cerrada su característica forma poliédrica (véase **FIGURA 7-33*a***). Además de proporcionar soporte para células individuales, las paredes celulares sirven en colectivo como un tipo de "esqueleto" para toda la planta. De hecho, un árbol sin paredes celulares podría parecerse, en muchos aspectos, a un ser humano sin huesos. Las paredes celulares también protegen la célula contra daños por abrasión mecánica y patógena, y median las interacciones célula-célula. Al igual que la ECM en la superficie de una célula animal, una pared celular vegetal es una fuente de señales que alteran las actividades de las células con las que contacta.

Las paredes celulares de las plantas a menudo se comparan con los materiales fabricados como el hormigón armado o la fibra de vidrio, que contienen un elemento fibroso incrustado en una matriz no fibrosa, similar al gel. La celulosa, cuya estructura se describió en la figura 2-17, proporciona el componente fibroso de la pared celular, y las proteínas y la pectina (descritas a continuación) proporcionan la matriz. Las moléculas de celulosa están organizadas en **microfibrillas** en forma de varilla (véase figura 7-33*b*, *c*) que confieren rigidez en la pared celular y proporcionan resistencia a las fuerzas de tracción (estiramiento). Cada microfibrilla tiene aproximadamente 5 nm de diámetro y se compone por lo general de haces de 36 moléculas de celulosa orientadas en paralelo entre sí y unidas por enlaces de hidrógeno. Las paredes de muchas células vegetales están compuestas por capas en las que las microfibrillas de una capa están orientadas aproximadamente a 90° con respecto a las capas adyacentes (véase figura 7-33*b*).

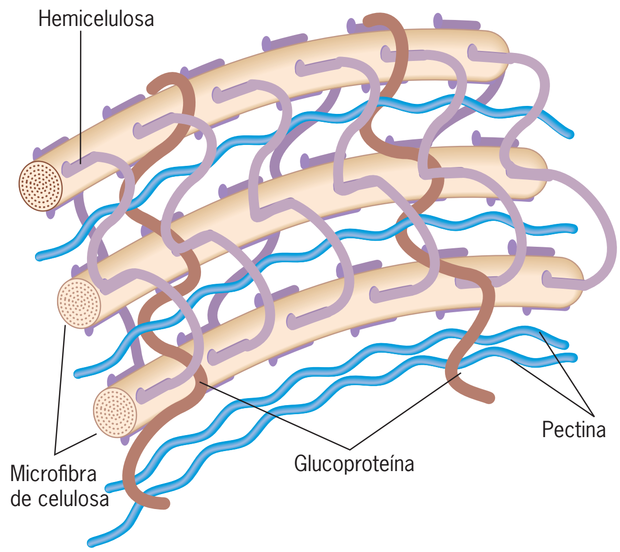
Las moléculas de celulosa se polimerizan en la superficie de la célula. Las subunidades de glucosa se agregan al extremo de una molécula de celulosa en crecimiento mediante una enzima multisubunidad llamada *celulosa sintasa*. Las subunidades de la enzima están organizadas en un anillo de seis miembros, o roseta, que está incrustado dentro de la membrana plasmática (véase figura 7-34*a*, *b*). Por el contrario, los materiales de la matriz se sintetizan dentro del citoplasma (véase **FIGURA 7-34*c***) y se transportan a la superficie celular en las vesículas secretoras. La matriz es altamente compleja y requiere cientos de enzimas para su síntesis y degradación. La matriz de la pared celular está compuesta por tres tipos de macromoléculas (véase figura 7-34*c*):




*a*)



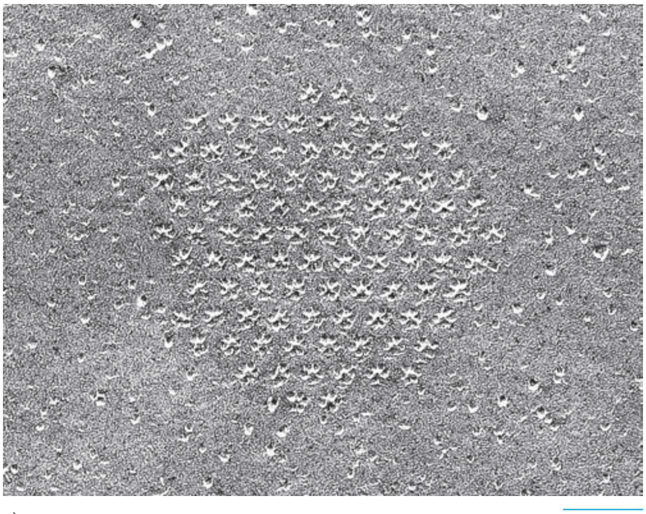

*b*)



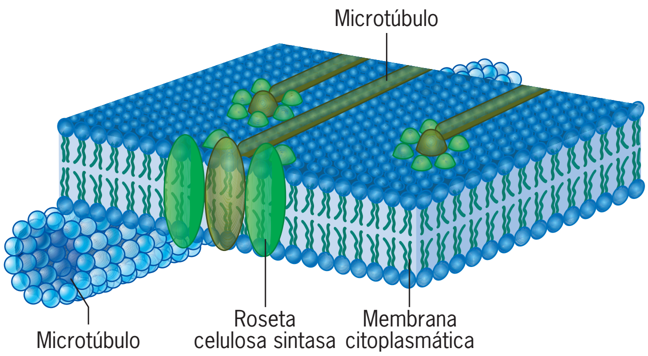

*c*)

**FIGURA 7-33 Pared celular de la planta.** *a*) Micrografía electrónica de una célula vegetal rodeada por su pared celular. La laminilla del medio es una capa que contiene pectina situada entre las paredes celulares adyacentes. *b*) Micrografía electrónica que muestra las microfibrillas de celulosa y los enlaces cruzados de hemicelulosa de una pared celular de cebolla después de la extracción de los polímeros de pectina no fibrosos. *c*) Diagrama esquemático de un modelo generalizado de una pared celular de planta.

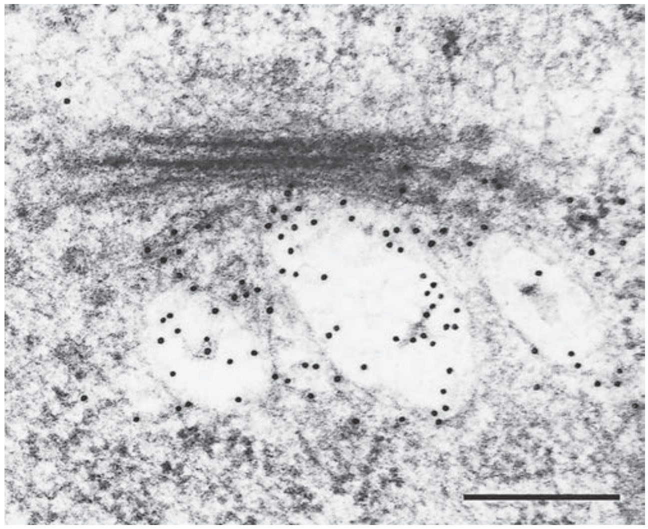
FUENTE: *a*) Omikron/Photo Researchers, Inc.; *b*) de Maureen Mccann, B. Wells y K. Roberts. *J Cell Sci* 1990;96:329; reproducida con permiso de The Company of Biologists, Ltd. http://jcs.biologists.org/content/96/2/323.full.pdf+html?sid=f1c1d0cf-55bf-4050-b9bb-af46eae08b0f.




a)




b)



c)

**FIGURA 7-34 Síntesis de las macromoléculas de la pared celular de la planta.** *a*) Réplica de fractura por congelada de la membrana plasmática de una célula de alga. Se cree que las rosetas representan la enzima sintetizadora de celulosa (la celulosa sintasa) situada dentro de la membrana plasmática. *b*) Un modelo de deposición de fibrilla de celulosa. Se considera que cada roseta forma una sola microfibrilla que se asocia de forma lateral con las microfibrillas de otras rosetas para formar una fibra más grande. El conjunto completo de rosetas podría moverse de manera lateral dentro de la membrana mientras las moléculas de celulosa que se alargan lo empuja. Los estudios sugieren que la dirección del movimiento de las rosetas de membrana está determinada por microtúbulos orientados presentes en el citoplasma cortical debajo de la membrana plasmática (discutido en el capítulo 9). *c*) Micrografía electrónica de un complejo de Golgi de una célula periférica de la raíz teñida con anticuerpos contra un polímero de ácido galacturónico, uno de los principales componentes de la pectina. Este material, como la hemicelulosa, se ensambla en el complejo de Golgi. Los anticuerpos se han relacionado con partículas de oro para que sean visibles como gránulos oscuros. La barra representa 0.25 mm.

FUENTE: *a*) De T. H. Giddings, Jr., DL Brower y LA Staehelin. *J. Cell Biol* 1980;84:332, fig. 6; reproducido con permiso de The Rockefeller University Press; *c*) De Margaret Lynch y L. A. Staehelin, *J Cell Biol* 1992;118:477, fig. 9; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

1. Las **hemicelulosas** son polisacáridos ramificados cuya cadena principal está constituida por un azúcar, como la glucosa, y cadenas laterales de otros azúcares, como la xilosa. Las moléculas de hemicelulosa se unen a las superficies de las microfibrillas de celulosa, y las retiran en una red estructural elástica.
2. Las **pectinas** son una clase heterogénea de polisacáridos cargados de forma negativa que contienen ácido galacturónico. Al igual que los glicosaminoglicanos de las matrices de células animales, las pectinas retienen agua y, por tanto, forman un gel hidratado extensivo que llena los espacios entre los elementos fibrosos. Cuando una planta es atacada por patógenos, los fragmentos de pectinas liberadas de la pared desencadenan una respuesta defensiva por parte de la célula de la planta. La pectina purificada se usa de manera comercial para proporcionar la consistencia tipo gel de mermeladas y jaleas.
3. Las **proteínas**, cuyas funciones no se comprenden bien, median las actividades dinámicas. Una clase, las *expansinas*, facilitan el crecimiento celular. Estas proteínas causan relajación localizada de la pared celular, lo que permite que la célula se alargue en ese sitio en respuesta a la presión de turgencia generada dentro de la célula. Las proteínas quinasas asociadas a la pared celular abarcan la membrana plasmática, y se cree que transmiten señales desde la pared celular al citoplasma.

Los porcentajes de estos diversos materiales en las paredes celulares son altamente variables, según el tipo de planta, el tipo de célula y la etapa de la pared. Al igual que las matrices extracelulares de los tejidos animales, las paredes celulares de las plantas son estructuras dinámicas que pueden modificarse en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales.

Las paredes celulares surgen como una **placa de células** delgada que se forma entre las membranas plasmáticas de las células hijas recién formadas después de la división celular. La pared celular madura por la incorporación de materiales adicionales que se ensamblan dentro de la célula y se secretan en el espacio extracelular. Además de proporcionar soporte mecánico y protección contra agentes extraños, la pared celular de una célula vegetal joven e indiferenciada debe poder crecer junto con el enorme crecimiento de la célula que la rodea. Las paredes de las células en crecimiento se llaman **paredes primarias** y poseen una extensibilidad que falta en las **paredes secundarias** más gruesas que se encuentran alrededor de muchas células de plantas maduras. La transformación de la pared celular primaria a secundaria ocurre a medida que la pared incrementa en contenido de celulosa y, en la mayoría de los casos, incorpora un polímero que contiene fenol denominado *lignina*. La lignina proporciona soporte estructural y es el componente principal de la madera. La lignina en las paredes de las células conductoras de agua del xilema proporciona el soporte requerido para mover el agua a través de la planta.

## REPASO

1. Describa los componentes que componen una pared celular vegetal y la función de cada uno en la estructura y función de la pared.
2. Distinga entre la celulosa y la hemicelulosa, una molécula de celulosa y una microfibrilla, una pared celular primaria y una pared celular secundaria.

# Preguntas analíticas



1. La adhesión celular a menudo puede bloquearse *in vitro* al tratar las células con agentes específicos. ¿Cuál de las siguientes sustancias se espera que interfiera con la adhesión celular mediada por las selectinas?, ¿cuál con la adhesión celular mediada por moléculas L1? Las sustancias son la tripsina, que digiere las proteínas; un péptido que contiene RGD; neuraminidasa, que elimina el ácido siálico de un oligosacárido; la colagenasa, que digiere colágeno; la hialuronidasa, que digiere el ácido hialurónico; EGTA, que une los iones de $Ca^{2+}$ en el medio.
2. ¿Qué sustancias se podrían agregar a una placa de cultivo para bloquear la migración de las células de la cresta neural?, ¿cuál para bloquear la adherencia de los fibroblastos al sustrato?
3. Los ratones que carecen de un gen para la fibronectina no sobreviven al desarrollo embrionario temprano. Nombre dos procesos que podrían ser afectados en dichos embriones.
4. Suponga que encontró que la molécula A, que tenía una masa molecular de 1 500 daltones, podía penetrar los canales de una unión gap, pero la molécula B, cuya masa molecular era de solo 1 200 daltones, no podía difundirse entre las mismas células. ¿Cómo son diferentes estas moléculas para explicar estos resultados?
5. ¿De qué manera son similares en construcción las matrices extracelulares de animales y las paredes celulares de las plantas?
6. Se observó que dos enfermedades autoinmunes diferentes, una que produce anticuerpos contra un componente de hemidesmosomas y la otra que produce anticuerpos contra un componente de desmosomas, causan ampollas severas en la piel. ¿Por qué cree que estas dos afecciones tienen síntomas similares?
7. ¿Cuál de los diversos tipos de moléculas que median la adhesión celular es más probable que sea responsable del tipo de clasificación demostrado por las células de la figura 7-20? ¿Por qué? ¿Cómo puede probar su conclusión?
8. La hormona foliculoestimulante (FSH, *follicle-stimulating hormone*) es una hormona hipofisiaria que actúa sobre las células del folículo del ovario para desencadenar la síntesis del AMP cíclico, que estimula diversos cambios metabólicos. La FSH suele no tener efecto sobre las células del músculo cardiaco. Sin embargo, cuando las células del folículo ovárico y las células del músculo cardiaco crecen juntas en un cultivo mixto, se observa que varias células del músculo cardiaco se contraen después de la adición de la FSH al medio. ¿Cómo podría explicarse esta observación?
9. ¿Por qué cree que las células animales pueden sobrevivir sin los tipos de paredes celulares que se encuentran en casi todos los otros grupos de organismos?
10. ¿Por qué se espera que la reducción de la temperatura del medio en el que crecen las células afecte la capacidad de las células para formar uniones gap entre sí?
11. Algunas de las uniones celulares aparecen como bandas circulares, mientras que otras aparecen como parches discretos. ¿Cómo se correlacionan estos dos tipos de disposiciones estructurales con las respectivas funciones de las uniones?
12. Proponga algún mecanismo que pueda explicar cómo el virus del mosaico del tabaco fue capaz de alterar la permeabilidad de un plasmodesmo. ¿Cómo podría probar su propuesta?
13. Un tipo de célula de vertebrado que se cree que carece de integrinas es el eritrocito (el glóbulo rojo). ¿Le sorprende esto? ¿Por qué, o por qué no?
14. Las adhesiones focales pueden soportar fuerzas mucho mayores que la fuerza adhesiva de una sola molécula de integrina. ¿Por qué? Supongamos que una adhesión focal puede soportar una fuerza de 5 $nN/\mu m^2$. Dado que un único enlace integrina-ligando puede resistir una fuerza de hasta 50 pN, calcule ¿cuántas moléculas de integrina están presentes en una sola adhesión focal con un área de superficie de 1 $\mu m^2$? (Véase **video tutorial cuantitativo**).

CAPÍTULO 8

# Sistemas de membrana citoplásmica: estructura, función y tráfico de membranas

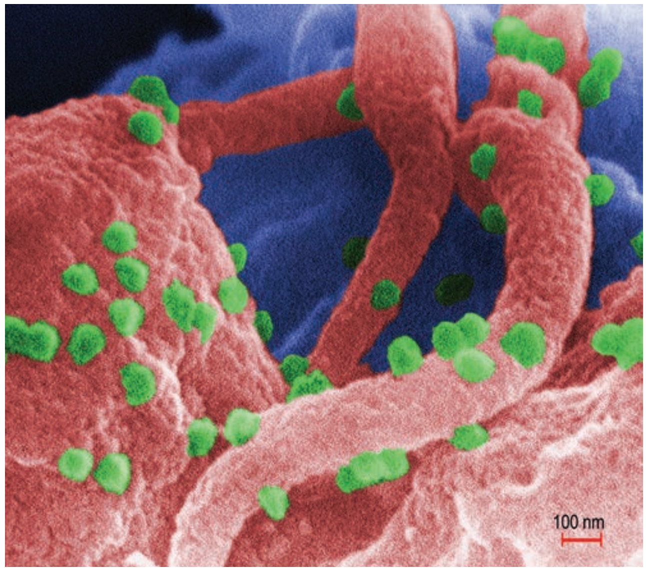
## EL SECUESTRO DE LA CÉLULA

Tener acceso a una célula animal plantea un desafío formidable para los posibles invasores. Los virus, sin embargo, han desarrollado una multitud de formas para superar obstáculos celulares con el fin de ejecutar sus programas de replicación. El secuestro de los sistemas de membrana celular —incluida la membrana plasmática, las vesículas endosomales, el retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*) y el complejo de Golgi— es fundamental para el ciclo de vida de los virus animales.

El primer desafío al que se enfrenta un virus es cómo ingresar a la célula. Algunos de ellos con envoltura, como el virus del herpes, se fusionan directamente con la membrana plasmática y depositan la cápside cargada de genoma dentro de la célula. Sin embargo, una mayor proporción de virus secuestra vías endocíticas para entrar en la célula, dejando pocos rastros en la superficie celular, de los cuales las células inmunes itinerantes pueden tomar nota. En estos casos, los virus se internalizan en vesículas conocidas como endosomas y luego liberan su genoma en la célula.

Otro desafío importante que enfrenta el virus es cómo replicar y producir nueva progenie viable. En años recientes, los investigadores han descubierto que los virus citoplásmicos a menudo llevan a cabo una reestructuración elaborada de las membranas de las células huésped, con mayor fre-

(*continúa*)




*Virus de la inmunodeficiencia humana* (HIV, *human inmunodeficiency virus*) *en un linfocito humano*. Esta imagen de escaneo EM pseudocoloreada demuestra partículas de HIV (verde) en la superficie de un linfocito (rosa). Muchos virus, incluido el HIV, deben secuestrar los sistemas de membrana de las células para ingresar, propagarse y salir de sus células anfitrionas.

FUENTE: CDC/C. Goldsmith, P. Feorino, E. L. Palmer, W. R. McManus / Center for Disease Control and Prevention.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**8.1** Una descripción del sistema de la endomembrana
**8.2** Algunos enfoques del estudio de las endomembranas
**8.3** El retículo endoplásmico
**8.4** Funciones del retículo endoplásmico rugoso
**8.5** Biosíntesis de membrana en el retículo endoplásmico
**8.6** Glucosilación en el retículo endoplásmico rugoso
**8.7** Mecanismos que aseguran la destrucción de proteínas mal plegadas
**8.8** Transporte vesicular del ER al Golgi
**8.9** El complejo de Golgi
**8.10** Tipos de vesículas de transporte
**8.11** Más allá del complejo de Golgi: clasificación de proteínas en el TGN
**8.12** **PERSPECTIVA HUMANA:** Trastornos resultantes de defectos en la función lisosomal
**8.13** Dirigir vesículas a un compartimiento particular
**8.14** Exocitosis
**8.15** Lisosomas
**8.16** Vacuolas de células vegetales
**8.17** Endocitosis
**8.18** **VÍAS EXPERIMENTALES:** Endocitosis mediada por receptor
**8.19** La vía endocítica
**8.20** Fagocitosis
**8.21** Captación postraduccional de proteínas por peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos

cuencia la membrana del ER, para crear estructuras nuevas de tipo organelo, denominadas fábricas de virus o viroplasma. Dentro de estas fábricas de virus, las proteínas virales requeridas para la replicación se organizan en líneas de ensamblaje para la producción eficiente de nuevas partículas virales. En muchos sentidos, estas fábricas funcionan como una versión a escala reducida de los organelos celulares de los que se derivan, pero diseñadas para la producción en masa de solo un puñado de moléculas, en lugar de las miles que los ER y el complejo de Golgi producen en cualquier célula.



## 8.1 Una descripción del sistema de la endomembrana

Bajo el microscopio de luz, el citoplasma de las células vivas aparece relativamente desprovisto de estructura. Desde antes del comienzo del siglo XX, el examen de secciones teñidas de tejidos animales insinuaba la existencia de una extensa red de membranas dentro del citoplasma. Sin embargo, no fue sino hasta el desarrollo del microscopio electrónico en la década de 1940 que los biólogos comenzaron a apreciar la gran variedad de estructuras unidas a la membrana presentes en el citoplasma de la mayoría de las células eucarióticas. Estos primeros microscopistas de electrones vieron vesículas de membrana de diámetro variable que contenían material de diferente densidad electrónica; canales largos delimitados por membranas que irradian a través del citoplasma para formar una red interconectada de canales, y pilas de sacos aplomados de membrana.

Se hizo evidente a partir de estos primeros estudios microscópicos de electrones y las investigaciones bioquímicas posteriores que el citoplasma de las células eucariotas se subdividió en una variedad de compartimientos distintos delimitados por barreras de membrana. A medida que se examinaron más tipos de células, se hizo evidente que estos compartimientos membranosos en el citoplasma formaban diferentes organelos que podían identificarse en diversas células, desde levaduras hasta plantas y animales multicelulares. El grado en que el citoplasma de una célula eucariota está ocupado por estructuras membranosas se ilustra en la micrografía electrónica de la célula de la raíz del maíz que se muestra en la **FIGURA 8-1**. Como veremos en las siguientes páginas, cada uno de estos organelos contiene un complemento particular de proteínas y está especializado en actividades específicas. Por tanto, al igual que una casa o restaurante se divide en salas especializadas donde las diferentes actividades pueden tener lugar de forma independiente, el citoplasma de una célula se divide en compartimientos membranosos especializados por razones análogas. Tenga en cuenta, al examinar las micrografías de este capítulo, que estos organelos citoplásmicos pueden aparecer como estructuras estables, como las habitaciones de una casa o restaurante, pero de hecho son compartimientos dinámicos que están en continuo flujo.

En el presente capítulo, examinaremos la estructura y las funciones del retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, los endosomas, los lisosomas y las vacuolas. Estos organelos forman un **sistema de endomembrana** en el que los componentes individuales funcionan como parte de una unidad coordinada. (Las mitocondrias y los cloroplastos no son parte de este sistema interconectado y fueron objeto de estudio en los capítulos 5 y 6). La evidencia actual sugiere que los peroxisomas, que también se discutieron en el capítulo 6, tienen un origen dual. Se cree que los elementos básicos de la membrana límite surgen del retículo endoplásmico, pero muchas de las proteínas de membrana y las proteínas solubles internas se toman del citosol como se describe en la sección 8.21.

Los organelos del sistema de endomembrana son parte de una red dinámica e integrada en la que los materiales se transportan de una parte a otra de la célula. En su mayor parte, los materiales se transportan entre organelos, desde el complejo de Golgi a la membrana plasmática, por ejemplo, en pequeñas vesículas de transporte con membrana que salen del compartimiento de la membrana del donante (**FIGURA 8-2*a***).[1] Las vesículas de transporte se mueven a través del citoplasma de forma dirigida, a menudo tiradas por proteínas motoras que operan en las vías formadas por microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto (véase figura 9-1*a*). Cuando llegan a su destino, las vesículas se fusionan con la membrana del compartimiento receptor, que recibe la carga soluble de la vesícula, así como su envoltura membranosa (figura 8-2*a*). Los ciclos repetidos de gemación y fusión transportan una gran variedad de materiales a lo largo de numerosas vías que atraviesan la célula.

Se han identificado varias vías distintas a través del citoplasma y se ilustran en la figura 8-2*b*). Se puede discernir una **vía biosintética** en la que las proteínas se sintetizan en el retículo endoplásmico, se modifican durante el paso a través del complejo de Golgi y se transportan desde el complejo de Golgi a diversos destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma o la gran vacuola de una célula vegetal. Esta ruta también se conoce como la **vía secretora** porque muchas de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico (así como los polisacáridos complejos sintetizados en el complejo de Golgi, figura 7-34*c*) están destinadas a ser des-

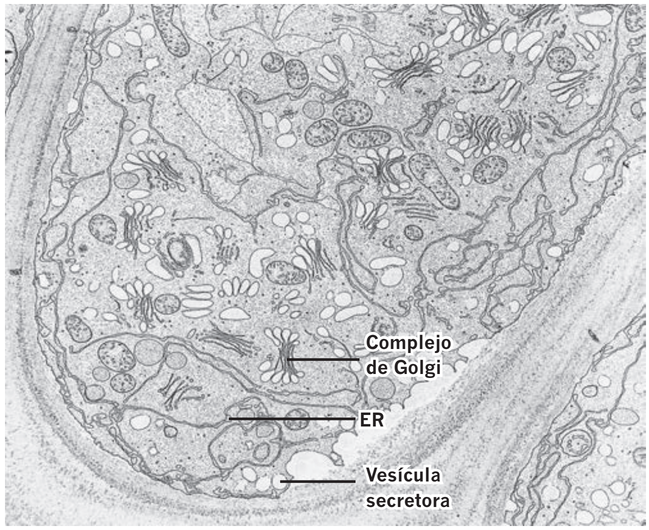
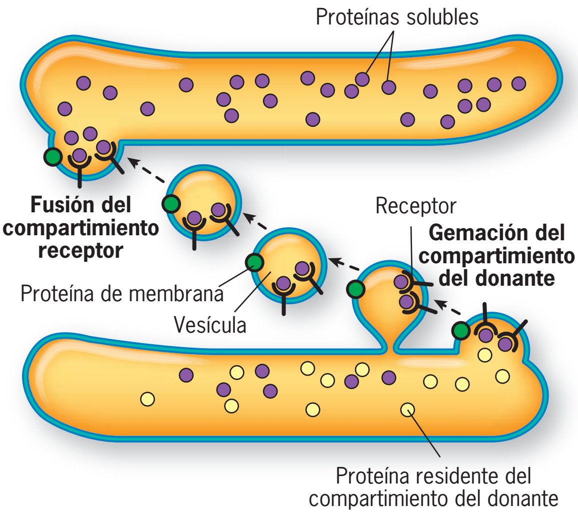
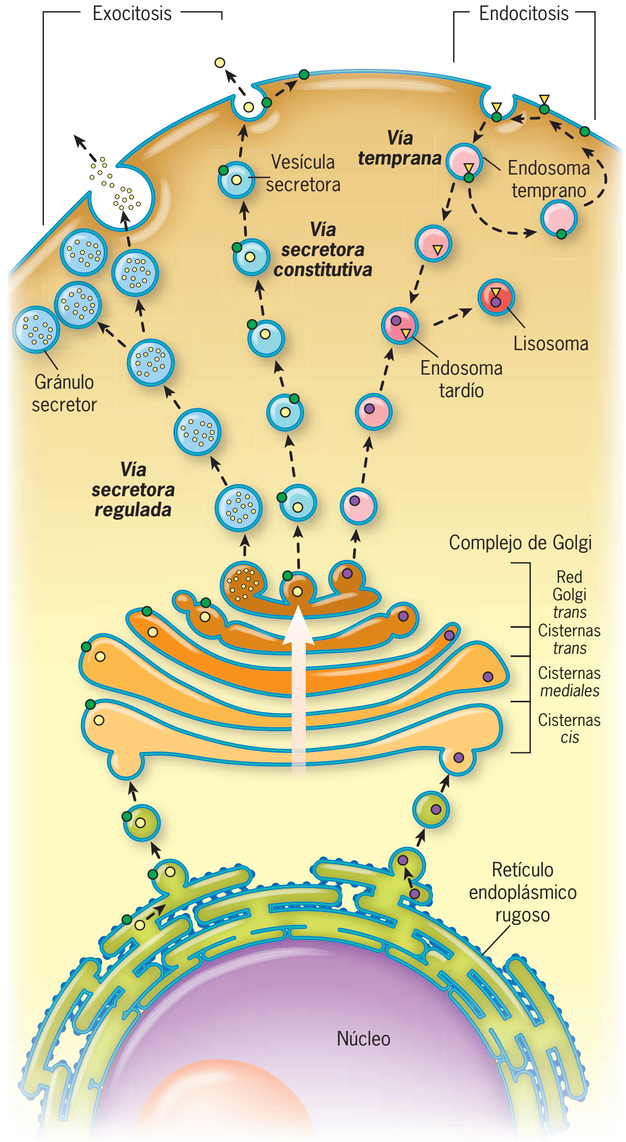



**FIGURA 8-1 Compartimientos del citoplasma unidos a la membrana.** El citoplasma de esta célula con cubierta de raíz de una planta de maíz contiene una matriz de organelos unidos a la membrana cuya estructura y función se examinarán en este capítulo. Como es evidente en esta micrografía, el área de superficie combinada de las membranas citoplásmicas es muchas veces mayor que la de la membrana plasmática circundante.
FUENTE: Cortesía de Hilton H. Mollenhauer.

[1] El término *vesícula* implica un portador esférico. La carga también puede ser transportada por portadores de membrana de forma irregular o tubular. En aras de la simplicidad, generalmente nos referiremos a los portadores como "vesículas", teniendo en cuenta que no siempre son esféricos.




*a*)




*b*)

**FIGURA 8-2 Descripción general de las vías biosintéticas/secretoras y endocíticas que unen las endomembranas en una red dinámica interconectada.** *a*) Diagrama esquemático que ilustra el proceso de transporte de vesículas por el cual los materiales son transportados desde un compartimiento donante a un compartimiento receptor. Las vesículas se forman por la membrana en gemación, durante la cual las proteínas de membrana específicas (esferas verdes) de la membrana del donante se incorporan en la membrana vesicular y las proteínas solubles específicas (esferas púrpuras) en el compartimiento del donador se unen a receptores específicos. Cuando la vesícula de transporte se fusiona luego a otra membrana, las proteínas de la membrana de la vesícula se convierten en parte de la membrana receptora, y las proteínas solubles quedan atrapadas dentro del lumen del compartimiento receptor. *b*) Los materiales siguen la ruta biosintética (o secretora) del retículo endoplásmico, a través del complejo de Golgi, y a varios lugares, incluyendo lisosomas, endosomas, vesículas secretoras, gránulos secretores, vacuolas y la membrana plasmática. Los materiales siguen la ruta endocítica desde la superficie de la célula hacia el interior por medio de endosomas y lisosomas, donde por lo general son degradadas por las enzimas lisosomales.

cargadas (**secretadas** o **exocitosadas**) de la célula. Las actividades secretoras de las células se pueden dividir en dos tipos: constitutivas y reguladas (figura 8-2 *b*). Durante la **secreción constitutiva**, los materiales se transportan en vesículas secretoras desde sus sitios de síntesis y se descargan en el espacio extracelular de forma continua. La mayoría de las células participan en la secreción constitutiva, un proceso que contribuye no solo a la formación de la matriz extracelular (sección 7.2), sino también a la formación de la membrana plasmática. Durante la **secreción regulada**, los materiales se almacenan como paquetes de membrana y se descargan solo en respuesta a un estímulo apropiado. La secreción regulada ocurre, por ejemplo, en las células endocrinas que liberan hormonas, en células acinares pancreáticas que liberan enzimas digestivas y en las células nerviosas que liberan neurotransmisores. En algunas de estas células los materiales que se van a secretar se almacenan en grandes **gránulos secretores** unidos a membrana, densamente empaquetados (véase **FIGURA 8-3**). Las proteínas, los lípidos y los polisacáridos complejos se transportan a través de la célula a lo largo de la vía biosintética o secretora. Nos centraremos en la primera parte del capítulo sobre síntesis y transporte de proteínas, como se resume en la figura 8-2*b*). Durante la discusión, consideraremos varias clases de proteínas. Estas incluyen proteínas solubles que se descargan de la célula, proteínas integrales de las diversas membranas indicadas en la figura 8-2*b*), y proteínas solubles que residen dentro de los diversos compartimientos encerrados por las endomembranas (p. ej., enzimas lisosomales). Mientras que los materiales se mueven fuera de la célula por la vía secretora, la **vía endocítica** opera en la dirección opuesta. Siguiendo la ruta endocítica, los materiales se mueven desde la superficie externa de la célula a los compartimientos, como los endosomas y los lisosomas, ubicados dentro del citoplasma (figura 8-2 *b*).

El movimiento de vesículas y su contenido a lo largo de las diversas vías de una célula es análogo al movimiento de camiones que transportan diferentes tipos de carga a lo largo de las diversas carreteras de una ciudad. Ambos tipos de transporte requieren patrones de tráfico definidos para garantizar que los materiales se envíen con precisión a los sitios apropiados. Por ejemplo, el tráfico de proteínas dentro de una glándula salival requiere que las proteínas del moco salival, que se sintetizan en el retículo endoplásmico, *se dirijan* específicamente a los gránulos secretores, mientras que las enzimas lisosomales, que también se fabrican en

el retículo endoplásmico, se dirigen hacia un lisosoma. Los diferentes organelos también contienen distintas proteínas integrales de membrana. En consecuencia, las proteínas de membrana también deben estar dirigidas a organelos particulares, como un lisosoma o una cisterna de Golgi. Estos diversos tipos de proteínas secretoras de carga, enzimas lisosomales y proteínas de membrana se dirigen a sus destinos celulares apropiados en virtud de "direcciones" específicas o *señales de clasificación* que están codificadas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o en oligosacáridos unidos. Las señales de clasificación son reconocidas por receptores específicos que residen en las membranas o capas superficiales de vesículas en gemación, asegurando que la proteína sea transportada al destino apropiado. En su mayor parte, la maquinaria responsable de conducir este complejo sistema de distribución consiste en proteínas solubles que se reclutan para superficies de membrana específicas. Durante el transcurso de este capítulo intentaremos comprender por qué se recluta una proteína, por ejemplo, para el retículo endoplásmico, mientras que otra proteína se puede reclutar en una región particular del complejo de Golgi.

Se han logrado grandes avances en las últimas tres décadas al mapear los patrones de tráfico que existen en las células eucariotas, identificar las direcciones y receptores específicos que rigen el flujo de tráfico y diseccionar la maquinaria que asegura que los materiales se entreguen a los sitios apropiados en la célula. Las proteínas motoras y los elementos del citoesqueleto, que desempeñan un papel clave en los movimientos de las vesículas de transporte y otras endomembranas, se describirán en el siguiente capítulo. Comenzaremos el estudio de las endomembranas discutiendo algunos de los enfoques experimentales más importantes que han llevado a nuestra comprensión actual del tema.

**REPASO**

1. Compare y contraste la ruta biosintética con la vía endocítica.
2. ¿Cómo se dirigen determinadas proteínas a compartimientos subcelulares particulares?

## 8.2 Algunos enfoques del estudio de las endomembranas

Los primeros estudios con el microscopio electrónico proporcionaron a los biólogos un retrato detallado de la estructura de las células, pero les dieron poca información sobre las funciones de los componentes que estaban observando. La determinación de las funciones de los organelos citoplásmicos requirió el desarrollo de nuevas técnicas y la ejecución de experimentos innovadores. Los enfoques experimentales descritos en las siguientes secciones han demostrado ser particularmente útiles para proporcionar la base del conocimiento en el que se basa la investigación actual sobre los organelos citoplásmicos.

### Conocimientos obtenidos de la autorradiografía

Entre las muchas células en el cuerpo, las células acinares del páncreas tienen un sistema de endomembrana bastante extenso. Estas células funcionan principalmente en la síntesis y secreción de enzimas digestivas. Después de la secreción del páncreas, estas enzimas se envían a través de conductos al intestino delgado, donde degradan la materia alimentaria ingerida. ¿Dónde dentro de las células acinares pancreáticas se sintetizan las proteínas secretoras, y cómo llegan a la superficie de las células donde se descargan? Estas preguntas son difíciles de responder porque todos los pasos en el proceso de secreción ocurren de modo simultáneo dentro de la célula. Para seguir los pasos de un solo ciclo de principio a fin, es decir, desde la síntesis de una proteína secretora hasta su descarga de la célula, James Jamieson y George Palade de la Universidad Rockefeller utilizaron la técnica de **autorradiografía** (sección 18.8).

La autorradiografía proporciona un medio para visualizar los procesos bioquímicos al permitir que un investigador determine la ubicación de los materiales marcados radiactivamente dentro de una célula. En esta técnica, las secciones de tejido que contienen isótopos radiactivos se cubren con una capa delgada de emulsión fotográfica, que se expone por la radiación que emana de los radioisótopos dentro del tejido. Los sitios en las células que contienen radioactividad se revelan bajo el microscopio mediante granos de plata en la emulsión suprayacente (**FIGURA 8-3**).

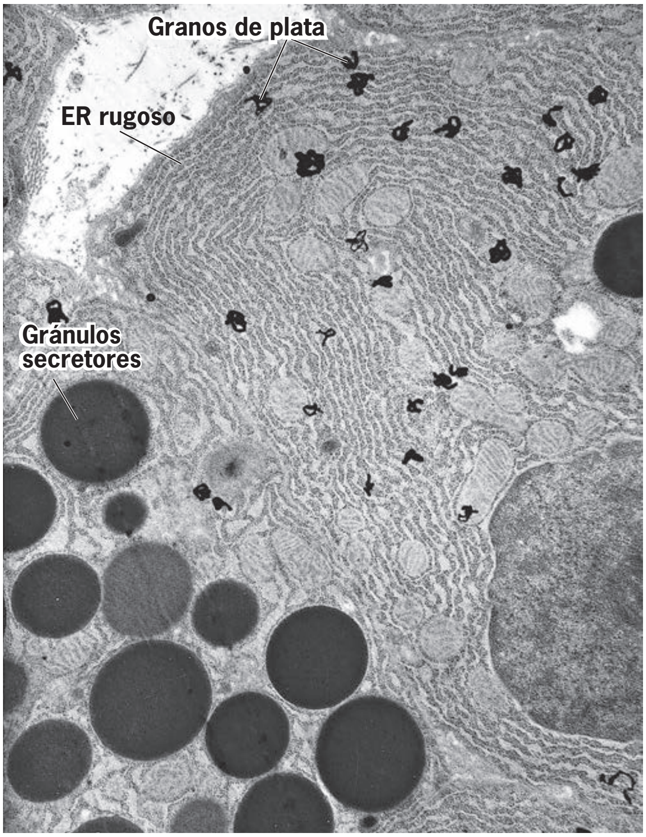
Para determinar los sitios donde se sintetizan las proteínas secretoras, Palade y Jamieson incubaron rebanadas de tejido pancreático en una solución que contiene aminoácidos radiactivos durante un breve periodo. Durante este periodo, los aminoácidos marcados fueron absorbidos por las células vivas y se incorporaron a las enzimas digestivas a medida que se sintetizaban en los ribosomas. Los tejidos se fijaron de forma rápida, y las ubicaciones de las proteínas que se habían sintetizado durante la breve incubación con aminoácidos marcados se determinaron autoradiográficamente. Usando este enfoque, se descubrió que el retículo endoplásmico era el sitio de síntesis de las proteínas secretoras (figura 8-3*a*).

Para determinar el camino intracelular seguido por las proteínas secretoras desde su sitio de síntesis hasta su sitio de descarga, Palade y Jamieson llevaron a cabo un experimento adicional. Después de incubar el tejido durante un breve periodo en aminoácidos radiactivos, lavaron el tejido libre de isótopos en exceso y transfirieron el tejido a un medio que contenía solo aminoácidos no marcados. Un experimento de este tipo se llama "*pulso-persecución*". El *pulso* se refiere a la breve incubación con radioactividad durante la cual los aminoácidos marcados se incorporan a la proteína. La *persecución* se refiere al periodo en que el tejido está expuesto al medio no marcado, un periodo durante el cual se sintetizan proteínas adicionales usando aminoácidos no radiactivos. Cuanto más larga sea la persecución, más lejos habrán viajado las proteínas radiactivas fabricadas durante el impulso desde su sitio de síntesis dentro de la célula. Utilizando este enfoque, uno puede idealmente seguir los movimientos de moléculas recién sintetizadas observando una onda de material radiactivo que se mueve a través de organelos citoplasmáticos de las células de una ubicación a la siguiente hasta que el proceso esté completo. Los resultados de estos experimentos, que primero definieron la vía biosintética (o secretora) y relacionaron una serie de compartimientos membranosos en apariencia separados en una unidad funcional integrada, se resumen en la figura 8-3*b-d*).

### Conocimientos obtenidos a partir del uso de la proteína verde fluorescente

Los experimentos autorradiográficos descritos en la sección previa requieren que los investigadores examinen con un microscopio electrónico secciones delgadas de diferentes células que se han fijado varias veces después de la introducción de una etiqueta radiactiva. Las técnicas que implican el uso de isótopos radiactivos han sido abandonadas por biólogos celulares modernos a favor del "marcado" de proteínas de interés usando proteínas fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), que permite ver el movimiento de proteínas en células vivas bajo un microscopio óptico (sección 18.3).

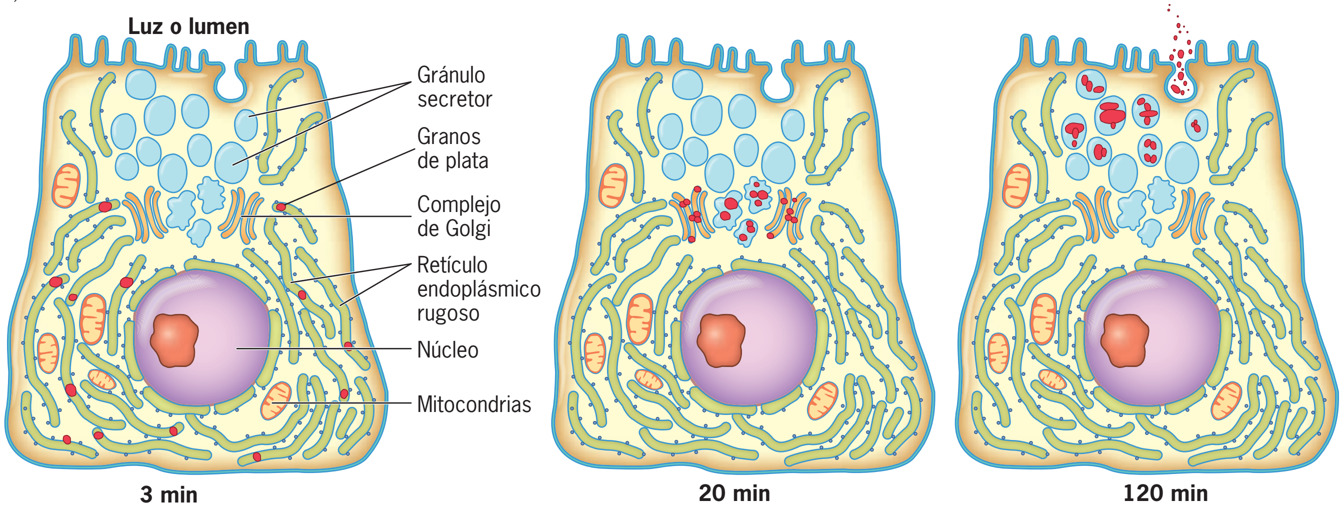
La **FIGURA 8-4** muestra un par de micrografías que representan células que contienen proteína etiquetada con GFP. En este caso, las células se infectaron con cepas del virus de la estomatitis




a)

**FIGURA 8-3 La autorradiografía revela los sitios de síntesis y posterior transporte de proteínas secretoras.** *a*) Micrografía electrónica de una sección de una célula acinar pancreática que se había incubado durante 3 minutos en aminoácidos radiactivos y luego se fijó y preparó inmediatamente para la autorradiografía. Los granos de plata negra que aparecen en la emulsión después del desarrollo se localizan sobre el retículo endoplásmico. *b-d*) Diagramas de una secuencia de autorradiografías que muestran el movimiento de las proteínas secretoras marcadas (representadas por los granos de plata en rojo) a través de una célula acinar pancreática. Cuando la célula se marca con pulso durante 3 minutos y se fija inmediatamente (como se muestra en a), la radioactividad se localiza en el retículo endoplásmico *b*). Después de un pulso de 3 minutos y una persecución de 17 minutos, el marcador radiactivo se concentra en el complejo de Golgi y las vesículas adyacentes *c*). Después de un pulso de 3 minutos y una persecución de 117 minutos, la radioactividad se concentra en los gránulos secretores y comienza a liberarse en los conductos pancreáticos *d*).

FUENTE: *a*) Cortesía de James D. Jamieson y George Palade.




b) c) d)

vesicular (VSV, *vesicular stomatitis virus*) en el que uno de los genes virales (*VSVG*) se fusiona con el gen *GFP*. Los virus son útiles en este tipo de estudios porque transforman las células infectadas en fábricas para la producción de proteínas virales, que se transportan como cualquier otra carga de proteínas a través de la vía biosintética. Cuando una célula está infectada con VSV, se producen cantidades masivas de la proteína VSVG en el retículo endoplásmico (ER). Las moléculas de VSVG atraviesan el complejo de Golgi y son transportadas a la membrana plasmática de la célula infectada donde se incorporan a las envolturas virales. Como en un experimento de persecución de pulso radiactivo, el uso de un virus permite a los investigadores seguir una onda relativamente sincrónica de movimiento de proteína, en este caso representada por una onda de fluorescencia verde que comienza poco después de la infección. La sincronización puede mejorarse, como se hizo en el experimento representado en la figura 8-4, mediante el uso de un virus con una proteína VSVG mutante que no puede abandonar el ER de células infectadas que crecen a una temperatura elevada (p. ej., 40 °C). Cuando la temperatura se reduce a 32 °C, la proteína GFP-VSVG fluorescente que se había acumulado en el ER (figura 8-4*a*, *c*) se mueve de forma sincrónica al complejo de Golgi (figura 8-4*b*, *c*), donde ocurren varios eventos de procesamiento, y luego a la membrana plasmática. Los mutantes de este tipo que funcionan normalmente a una temperatura reducida (permisiva), pero no a una temperatura elevada (restrictiva), se describen como *mutantes sensibles a la temperatura*. En la página 299 se describe un experimento que utiliza dos sondas fluorescentes diferentes.

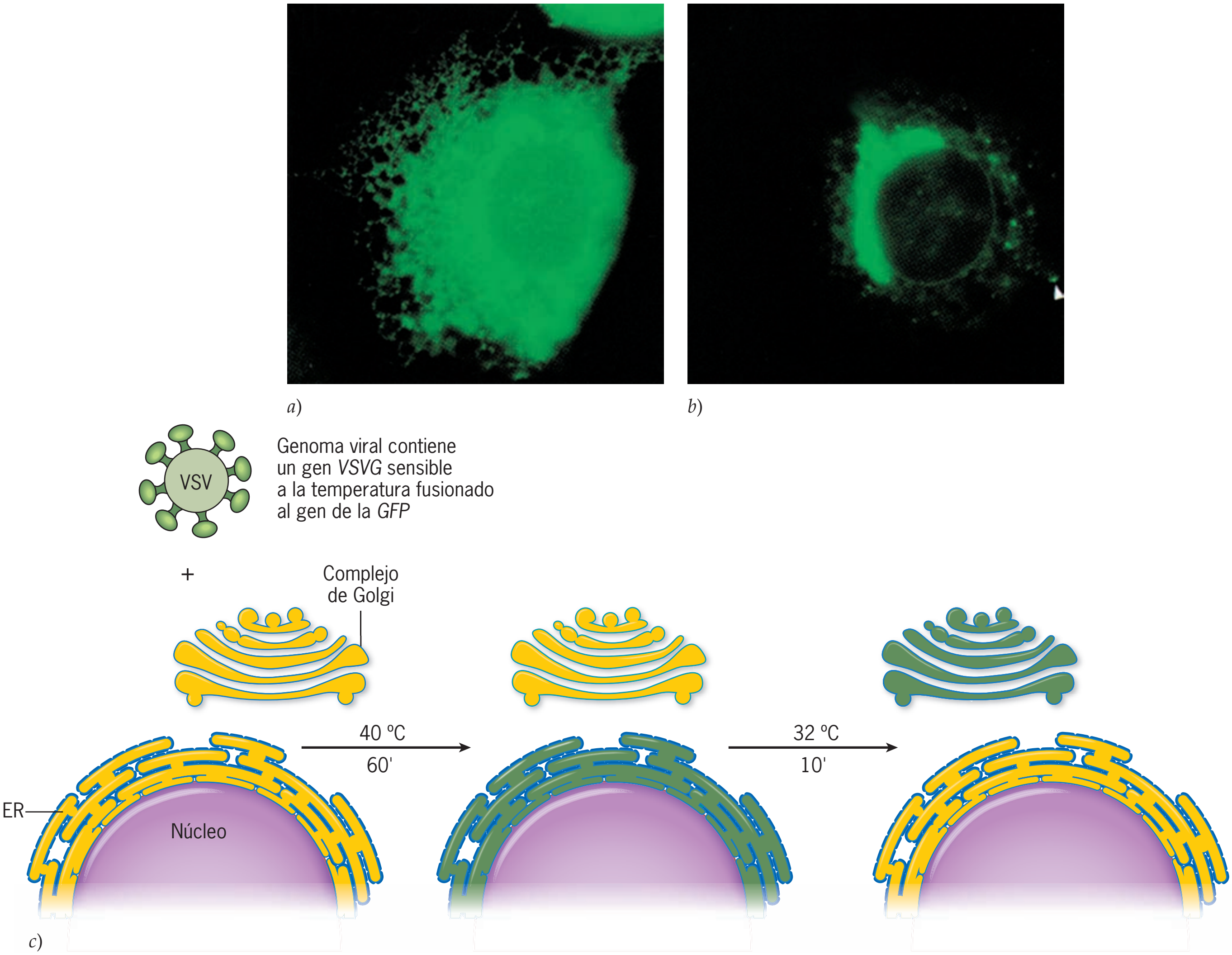



**FIGURA 8-4 El uso de la proteína fluorescente verde (GFP) revela el movimiento de proteínas dentro de una célula viva.** *a*) Micrografía de fluorescencia de una célula de mamífero cultivada en vivo que había sido infectada con el virus VSV a 40 °C. Esta cepa particular del virus VSV contenía un gen VSVG que 1) se fusionó con un gen que codifica la proteína fluorescente GFP y 2) contenía una mutación sensible a la temperatura que impedía que la proteína VSVG recién sintetizada abandonara el ER cuando se mantuvo a 40 °C. La fluorescencia verde en esta micrografía está restringida al ER. *b*) Micrografía de fluorescencia de una célula infectada viva que se mantuvo a 40 °C para permitir que la proteína VSVG se acumule en el ER y luego se incubó a 32 °C durante 10 minutos. La proteína VSVG fluorescente se ha movido al complejo de Golgi. *c*) Dibujo esquemático que muestra la retención de la proteína VSVG mutante en el ER a 40 °C y su movimiento sincrónico al complejo de Golgi dentro de los 10 minutos de incubación a la temperatura más baja.

FUENTE: *b*) Tomada de Daniel S. Chao, *et al*. Cortesía de Richard H. Scheller. *J Cell Biol* 1999;144:873; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

## Conocimientos obtenidos del análisis de fracciones subcelulares

La microscopía electrónica, la autorradiografía y el uso de GFP proporcionan información sobre la estructura y la función de los organelos celulares, pero no brindan conocimientos acerca de la composición molecular de estas estructuras. Las técnicas para romper (**homogeneizar**) las células y aislar tipos particulares de organelos fueron iniciadas en los años 1950 y 1960 por Albert Claude y Christian De Duve. Cuando una célula se rompe por homogeneización, las membranas citoplásmicas se fragmentan y los bordes fracturados de los fragmentos de la membrana se fusionan para formar vesículas esféricas de menos de 100 *nm* de diámetro. Las vesículas derivadas de diferentes organelos (núcleo, mitocondria, membrana plasmática, retículo endoplásmico, etc.) tienen diferentes propiedades que les permiten separarse una de otra, un enfoque que se denomina **fraccionamiento subcelular**.

Las vesículas membranosas derivadas del sistema de endomembrana (principalmente el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi) forman una colección heterogénea de vesículas de tamaño similar denominadas **microsomas**. En la **FIGURA 8-5*a*)** se muestra una preparación rápida (y cruda) de la fracción microsomal de una célula. La fracción microsomal se puede fraccionar aún más en las fracciones lisas y rugosas de la membrana (figura 8-5*b, c*) mediante las técnicas de gradiente discutidas en la sección 18-6. Una vez aislada, se puede determinar la composición bioquímica de varias fracciones. En los últimos años, la identificación de las proteínas presentes en las fracciones celulares se ha llevado a cabo utilizando tecnología proteómica. Una vez que se ha aislado un organelo particular, las proteínas pueden extraerse, separarse e identificarse mediante espectrometría de masas como se discutió en la sección 18.6. Cientos de proteínas pueden identificarse de forma simultánea, proporcionando un retrato molecular completo de cualquier organelo que pueda prepararse en un estado relativamente puro. En un ejemplo de esta tecnología, se descubrió que un fagosoma simple (sección 8.20) que contenía un cordón de látex ingerido comprendía más de 160 proteínas diferentes, muchas de las cuales nunca se habían identificado previamente o no se sabía que estaban involucradas en la fagocitosis.

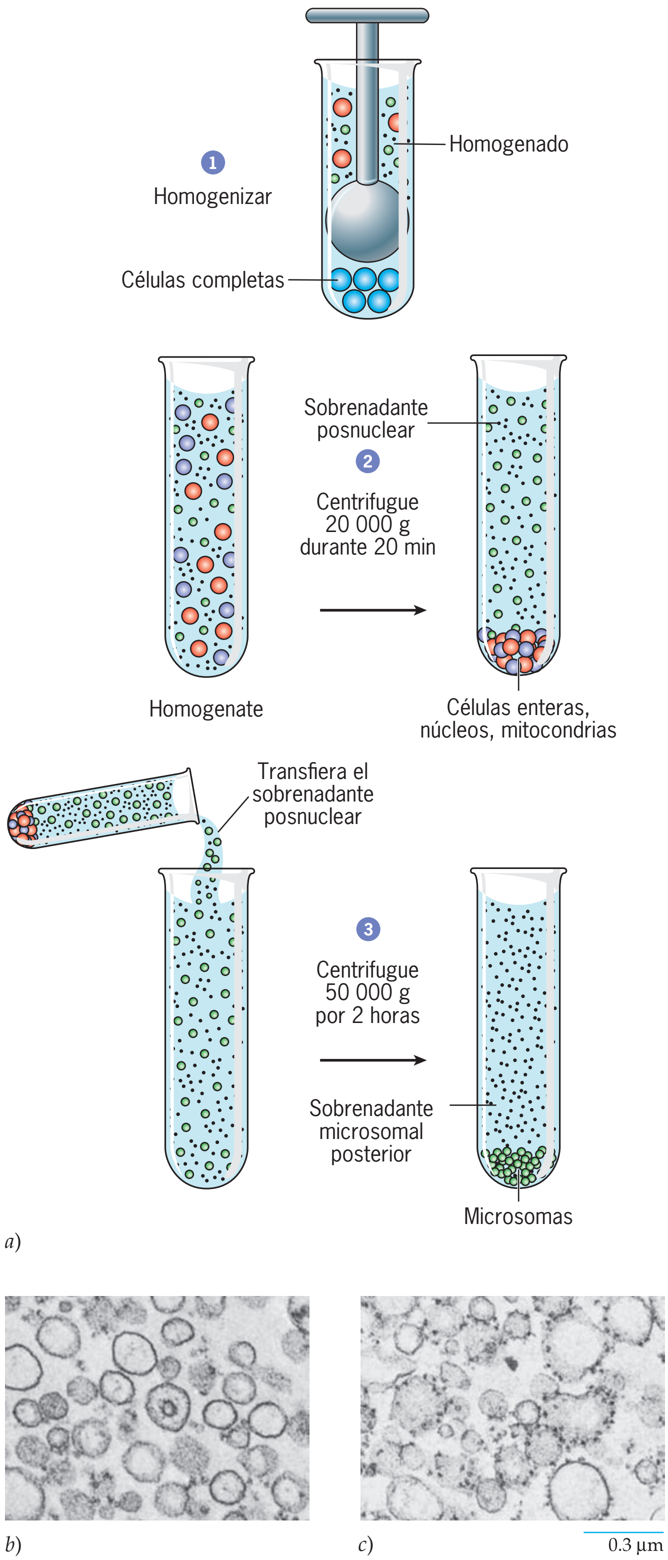



**FIGURA 8-5 Aislamiento de una fracción microsomal por centrifugación diferencial.** *a*) Cuando una célula se rompe por homogenización mecánica (paso 1), los diversos organelos membranosos se fragmentan y forman vesículas membranosas esféricas. Las vesículas derivadas de diferentes organelos se pueden separar mediante diversas técnicas de centrifugación. En el procedimiento representado aquí, el homogenado de células se somete primero a centrifugación a baja velocidad para sedimentar las partículas más grandes, como núcleos y mitocondrias, dejando las vesículas más pequeñas (microsomas) en el sobrenadante (paso 2). Los microsomas se pueden eliminar del sobrenadante por centrifugación a velocidades más altas durante periodos más largos (paso 3). Una fracción microsomal cruda de este tipo se puede fraccionar en diferentes tipos de vesículas en etapas posteriores. *b*) Micrografía electrónica de una fracción microsómica suave en la que las vesículas membranosas carecen de ribosomas. *c*) Micrografía electrónica de una fracción microsomal rugosa que contiene membranas tachonadas con ribosomas.

FUENTE: *b*, *c*) Cortesía de J. A. Higgins y R. J. Barnett.

## Información obtenida a partir del uso de sistemas sin células

Una vez que se desarrollaron las técnicas para fraccionar organelos membranosos, los investigadores comenzaron a investigar las capacidades de estas preparaciones subcelulares crudas. Descubrieron que las partes aisladas de una célula eran capaces de actividades notables. Estos primeros **sistemas libres de células**, llamados así porque no contenían células completas, proporcionaban una gran cantidad de información sobre procesos biológicos que eran imposibles de estudiar en el complejo entorno de las células intactas. Durante la década de 1960, por ejemplo, George Palade, Philip Siekevitz y sus colegas de la Universidad Rockefeller se propusieron aprender más sobre las propiedades de la fracción microsómica rugosa (que se muestra en la figura 8-5*c*), cuyas vesículas de membrana se derivan del ER rugoso (sección 8.4). Descubrieron que podían despojar una preparación microsómica rugosa de las partículas saturadas, y las partículas aisladas (es decir, los ribosomas) podían sintetizar proteínas cuando se les proporcionaban los ingredientes requeridos del citosol. Bajo estas condiciones, las proteínas recién sintetizadas fueron simplemente liberadas por los ribosomas en el fluido acuoso del tubo de ensayo. Cuando se llevó a cabo el mismo experimento utilizando microsomas rugosos intactos, las proteínas recién sintetizadas ya no se liberaron en el medio de incubación, sino que quedaron atrapadas dentro de la luz de las vesículas membranosas. A partir de estos estudios, se concluyó que la membrana microsómica no era necesaria para la incorporación de aminoácidos en las proteínas, sino para secuestrar proteínas secretoras recién sintetizadas en el espacio cisternal del ER.

En las últimas décadas, los investigadores han utilizado sistemas libres de células para identificar las funciones de muchas de las proteínas involucradas en el tráfico de membranas. James Rothman y Randy Schekman, ganadores del Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2013, se han destacado por su uso de sistemas libres de células en su investigación sobre el tráfico de vesículas. La **FIGURA 8-6** muestra un liposoma con vesículas que brotan de su superficie (flechas) a partir de un experimento realizado en el laboratorio de Schekman. Como se discutió en la página 120, los liposomas son vesículas cuya superficie consiste en una bicapa artificial que se crea en el laboratorio a partir de fosfolípidos purificados. Los brotes y las vesículas que se ven en la figura 8-6 se produjeron después de que la preparación de los liposomas se incubó con proteínas purificadas que normalmente comprenden capas sobre la superficie citosólica de las vesículas de transporte dentro de la célula. Sin las proteínas de la cubierta añadidas, la gemación de la vesícula no podría ocurrir.

Usando esta estrategia en la que los procesos celulares se *reconstituyen in vitro* a partir de componentes purificados, los investigadores han podido estudiar las proteínas que se unen a la membrana para iniciar la formación de vesículas, las proteínas responsables de la selección de carga y las proteínas que cortan la vesícula de la membrana del donante.

## Información obtenida del estudio de fenotipos mutantes

Un mutante es un organismo (o célula cultivada) cuyos cromosomas contienen uno o más genes que codifican proteínas anormales. Cuando una proteína codificada por un gen mutante no puede llevar a cabo su función normal, la célula que porta la mutación presenta una deficiencia característica. La determinación de la

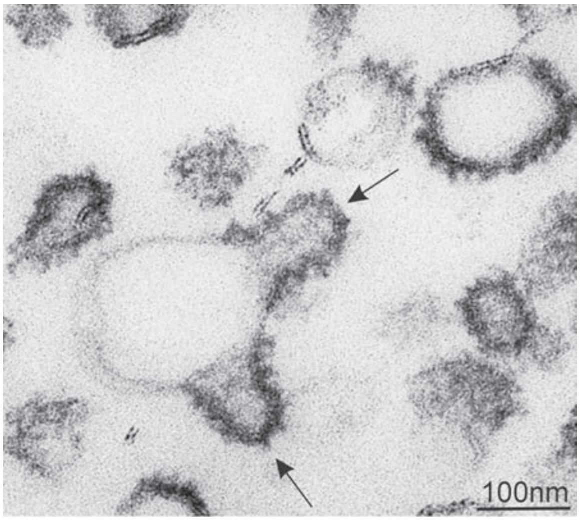



**FIGURA 8-6 Formación de vesículas recubiertas en un sistema libre de células.** Electromicrografía de una preparación de liposomas que ha sido incubado con los componentes requeridos para promover la formación de brotes de vesículas dentro de la célula. Las proteínas en el medio se han unido a la superficie de los liposomas y han inducido la formación de brotes recubiertos de proteína (flechas).

FUENTE: Cortesía de Lelio Orci y Randy Schekman.

naturaleza precisa de la deficiencia proporciona información sobre la función de la proteína normal. Los estudios a gran escala de la base genética de la secreción se han llevado a cabo en gran parte en células de levadura, especialmente por Randy Schekman y sus colegas (véase video **"Recorrido experimental: detección de mutantes sec"** para este capítulo).

En la levadura, como en todas las células eucariotas, las vesículas salen del ER y viajan al complejo de Golgi, donde se fusionan con las cisternas de Golgi (**FIGURA 8-7*a***). Para identificar los genes cuya proteína codificada está implicada en esta porción de la ruta secretora (es decir, genes sec), los investigadores seleccionan células mutantes que exhiben una distribución anormal de las membranas citoplásmicas. En la figura 8-7*b*) se muestra una micrografía electrónica de una célula de levadura tipo silvestre. La célula representada en la figura 8-7*c*) tiene una mutación en un gen que codifica una proteína implicada en la formación de vesículas en la membrana ER (paso 1, figura 8-7*a*). En ausencia de formación de vesículas, las células mutantes acumulan un retículo endoplásmico expandido. Por el contrario, la célula representada en la figura 8-7*d*) lleva una mutación en un gen que codifica una proteína implicada en la fusión de vesículas (paso 2, figura 8-7*a*). Cuando este producto génico es defectuoso, las células mutantes acumulan un exceso de vesículas sin fusionar. Los investigadores han aislado docenas de diferentes mutantes que, tomadas como un grupo, muestran interrupciones en prácticamente

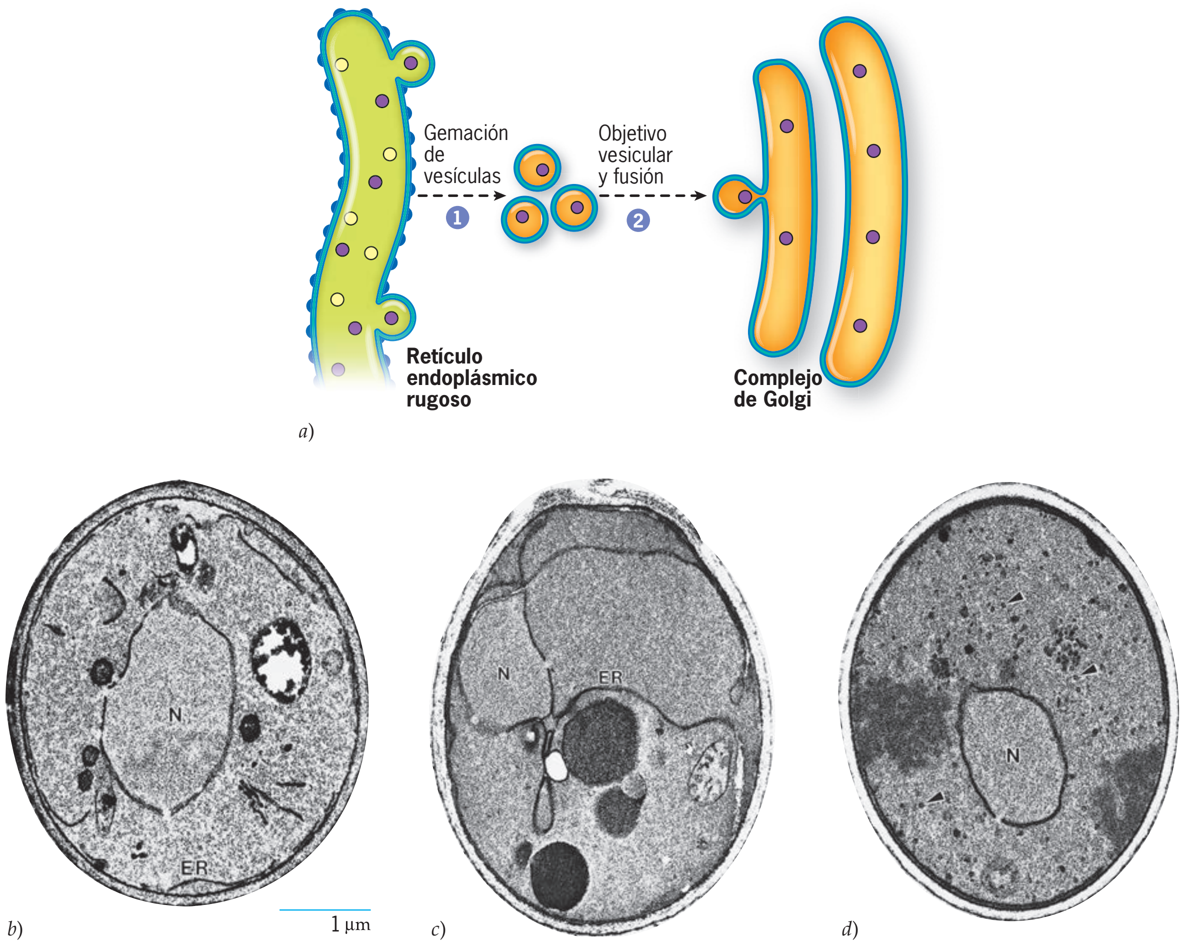



**FIGURA 8-7 El uso de mutantes genéticos en el estudio de la secreción.** *a*) La primera etapa de la vía secretora biosintética en la levadura en gemación. Los pasos se describen a continuación. *b*) Micrografía electrónica de una sección a través de una célula de levadura de tipo salvaje. *c*) Una célula de levadura que porta una mutación en el gen *sec12* cuyo producto está implicado en la formación de vesículas en la membrana de ER (paso 1, parte *a*). Debido a que las vesículas no se pueden formar, las cisternas de ER expandidas se acumulan en la célula. *d*) Una célula de levadura que porta una mutación en el gen *sec17*, cuyo producto está involucrado en la fusión de vesículas (paso 2, parte a). Debido a que no pueden fusionarse con las membranas de Golgi, las vesículas (indicadas por las puntas de flecha) se acumulan en la célula. [Los mutantes representados en *c*) y *d*) son mutantes sensibles a la temperatura. Cuando se mantienen a la temperatura más baja (permisiva), son capaces de crecimiento y división normales].

FUENTE: de Chris A. Kaiser y Randy Schekman. *Cell* 1990;61:724; © 1990, reimpresa con permiso de Elsevier.

cada paso de la vía secretora. Los genes responsables de estos defectos han sido clonados y secuenciados, y las proteínas que codifican han sido aisladas. El aislamiento de proteínas de levadura ha lanzado búsquedas exitosas de proteínas homólogas (es decir, proteínas con secuencia relacionada) en mamíferos.

Una de las lecciones más importantes aprendidas del uso de todas estas técnicas es que las actividades dinámicas del sistema de endomembrana están muy conservadas. Las levaduras, plantas, insectos y células humanas no solo llevan a cabo procesos similares, sino que lo hacen con proteínas bastante similares. Es evidente que la diversidad estructural de las células contradice sus similitudes moleculares subyacentes. En muchos casos, las proteínas de especies divergentes son intercambiables. Por ejemplo, los sistemas libres de células derivadas de células de mamífero a menudo pueden utilizar proteínas de levadura para facilitar el transporte de vesículas. Por el contrario, las deficiencias genéticas de las células de levadura que alteran algunas fases de la ruta biosintética a menudo se pueden "curar" mediante ingeniería genética para transportar genes de mamíferos.

Durante la última década, o menos, los investigadores interesados en buscar genes que afectan un proceso celular particular en células vegetales o animales se han aprovechado de un fenómeno celular llamado *interferencia de RNA* (*RNAi*). El RNAi es un proceso en el cual las células producen RNA pequeños (llamados *siRNA*) que se unen a mRNA específicos e inhiben la traducción de estos mRNA en proteínas. Este fenómeno y su uso se discuten en detalle en las secciones 11.10 y 18.25. Para el presente propósito, solo señalaremos que los investigadores pueden sintetizar una colección (biblioteca) de siRNA que son capaces de inhibir la traducción de prácticamente cualquier mRNA que sea producido por un genoma. Cada mRNA representa la expresión de un gen específico; por tanto, uno puede encontrar qué genes están involucrados en un proceso particular al determinar qué siRNA interfieren con ese proceso. En el experimento representado en la **FIGURA 8-8**, los investigadores se propusieron identificar genes que estaban implicados en varios pasos de la vía secretora, un objetivo similar al de los investigadores que estudian los mutantes de levadura que se muestran en la figura 8-7. En este caso, los investigadores utilizaron una cepa de células cultivadas de *Drosophila* e intentaron identificar genes que afectaban la localización de la manosidasa II, una enzima que se sintetiza en el retículo endoplásmico y se mueve a través de vesículas de transporte al complejo de Golgi, donde se establece la residencia. La figura 8-8*a*), muestra una célula de control que está sintetizando una versión marcada con GFP de manosidasa II; la fluorescencia se localiza en los numerosos complejos de Golgi de la célula como se esperaría. La figura 8-8*b*) muestra una célula que contiene moléculas de siRNA que han provocado una reubicación de la GFP-manosidasa en el ER, que se ve fusionada con los complejos de Golgi. Este tipo de fenotipo suele ser causado por la ausencia de una de las proteínas implicadas en el transporte de la enzima desde el ER al complejo de Golgi. De los 130 siRNA diferentes que se encontraron que interfieren de alguna manera con la vía secretora en este estudio, 31 de ellos generaron un fenotipo similar al que se muestra en la figura 8-8*b*). Incluidos entre estos 31 siRNA había numerosas especies que inhibían la expresión de genes que ya se sabía que estaban implicados en la vía secretora. Además, el estudio identificó otros genes cuya función era desconocida y ahora se presume que también están involucrados en estos procesos. Debido a que es más fácil sintetizar un RNA pequeño que generar un organismo con un gen mutante, el RNAi se ha convertido en una estrategia común para investigar el efecto de una proteína faltante.

**REPASO**

1. Describa las diferencias entre una autorradiografía de una célula del páncreas que se había incubado en aminoácidos marcados durante 3 minutos e inmediatamente fijada y una de una célula que se había marcado durante 3 minutos, se persiguió durante 40 minutos y luego se reparó.
2. ¿Qué técnicas o enfoques podría usar para saber qué proteínas están presentes en el retículo endoplásmico?
3. ¿De qué manera el aislamiento de una levadura mutante que acumula vesículas proporciona información sobre el proceso del tráfico de proteínas?
4. ¿Cómo se puede usar GFP para estudiar la dinámica de la membrana?

## 8.3 El retículo endoplásmico

El **retículo endoplásmico (ER)** comprende una red de membranas que penetra gran parte del citoplasma. El ER quizás evolucionó de invaginaciones de la membrana plasmática como se describe en la sección 1.9. Dentro del ER se encuentra un espacio extenso, o luz, que está separado del citosol circundante por la membrana del ER. Como será evidente en la siguiente discusión, la composición del espacio **luminal** (o cisternal) dentro de las membranas del ER es bastante diferente de la del espacio citosólico circundante. Al igual que otros organelos subcelulares, el ER es una estructura altamente dinámica sometida a rotación y reorganización continua.

El retículo endoplásmico se divide en dos subcompartimientos, el **retículo endoplásmico rugoso** (**RER,** *rough endoplasmic reticulum*) y el **retículo endoplásmico liso** (**SER**, *smooth endoplasmic reticulum*). El ER rugoso se define por la presencia de ribosomas unidos a su superficie citosólica, mientras que el ER liso no se asocia a ribosomas. El RER se compone típicamente de una red de sacos aplanados (**cisterna**), como se muestra en la **FIGURA 8-9*a*)** y 8-9*c*), donde cada capa está conectada a sus vecinos por membranas helicoidales (figura 8-9*b*). El RER es continuo con la membrana externa de la envoltura nuclear, que también porta ribosomas en su superficie citosólica (figura 8-2*b*). Por el

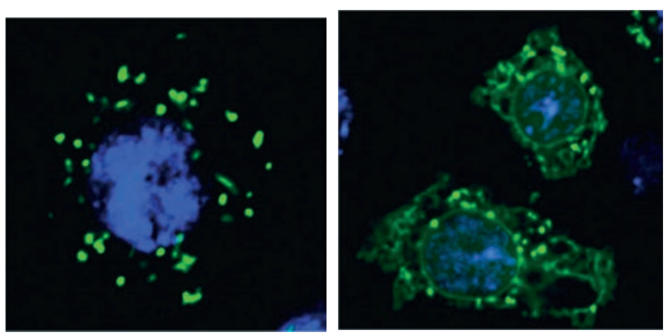

*a*) *b*)

**FIGURA 8-8 Inhibición de la expresión génica con interferencia de RNA.** *a*) Célula cultivada de control *Drosophila S2* que expresa la manosidasa II marcada con GFP. La enzima fluorescente se localiza en el complejo de Golgi después de su síntesis en el ER. *b*) Una célula que ha sido genéticamente modificada para expresar un siRNA específico, que se une a un mRNA complementario e inhibe la traducción de la proteína codificada. En este caso, el siRNA ha provocado que la enzima fluorescente permanezca en el ER, que se ha fusionado con las membranas de Golgi. Este fenotipo sugiere que el mRNA que se ve afectado por el siRNA codifica una proteína implicada en un paso temprano de la ruta secretora durante el cual la enzima se sintetiza en el ER y se dirige al complejo de Golgi. Entre los genes que exhiben este fenotipo cuando se dirigen los siRNA, están aquellos que codifican proteínas de la capa de COPI, Sar1 y Sec23. Las funciones de estas proteínas se discuten más adelante en el capítulo.

FUENTE: *a*) Tomada de Frederic Bard, *et al*. Cortesía de Vivek Malhotra. *Nature* 2006;439:604; © 2006, reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd.; *b*) de Frederic Bard, *et al*. Cortesía de Vivek Malhotra. *Nature* 2006;439:604; © 2006, reimpresa con autorización de Macmillan Publishers Ltd.

contrario, las membranas del SER son muy curvas y tubulares, formando un sistema interconectado de tuberías que atraviesan el citoplasma (figura 8-9*a*). Cuando las células se homogeneizan, los túbulos de SER se fragmentan en vesículas de superficie lisa, mientras que las placas de RER se fragmentan en vesículas ásperas de superficie rugosa (figura 8-5 *b*, *c*).

Las proteínas y los lípidos marcados fluorescentemente son capaces de difundir de un tipo de ER al otro, lo que indica que sus membranas son continuas. De hecho, los dos tipos de ER comparten muchas de las mismas proteínas y participan en ciertas actividades comunes, como la síntesis de ciertos lípidos y colesterol. Al mismo tiempo, numerosas proteínas se encuentran solo en uno u otro tipo de ER. Por ejemplo, el alto grado de curvatura de los túbulos de SER es inducido y mantenido por la presencia de un gran número de proteínas del doblado de membrana, llamadas reticulones, que solo están presentes en pequeñas cantidades en los bordes de las láminas de RER aplanado. El RER, por el contrario, contiene altos niveles de proteínas involucradas en el movimiento de las proteínas nacientes en la luz del ER.

Diferentes tipos de células contienen proporciones marcadamente diferentes de los dos tipos de ER, dependiendo de las actividades de la célula. Por ejemplo, las células que secretan grandes cantidades de proteínas, como las células del páncreas o las glándulas salivales, tienen extensas regiones de RER (figura 8-9*b*-*d*). Volveremos a la función del RER en breve, pero primero describiremos las actividades del SER.

## El retículo endoplásmico liso

El SER está ampliamente desarrollado en varios tipos de células, incluidas las del músculo esquelético, los túbulos renales y las glándulas endocrinas productoras de esteroides (**FIGURA 8-10**). Las funciones del SER incluyen:

- Síntesis de hormonas esteroides en las células endocrinas de la corteza suprarrenal y gónada.
- Desintoxicación en el hígado de una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluidos barbitúricos y etanol, cuyo uso

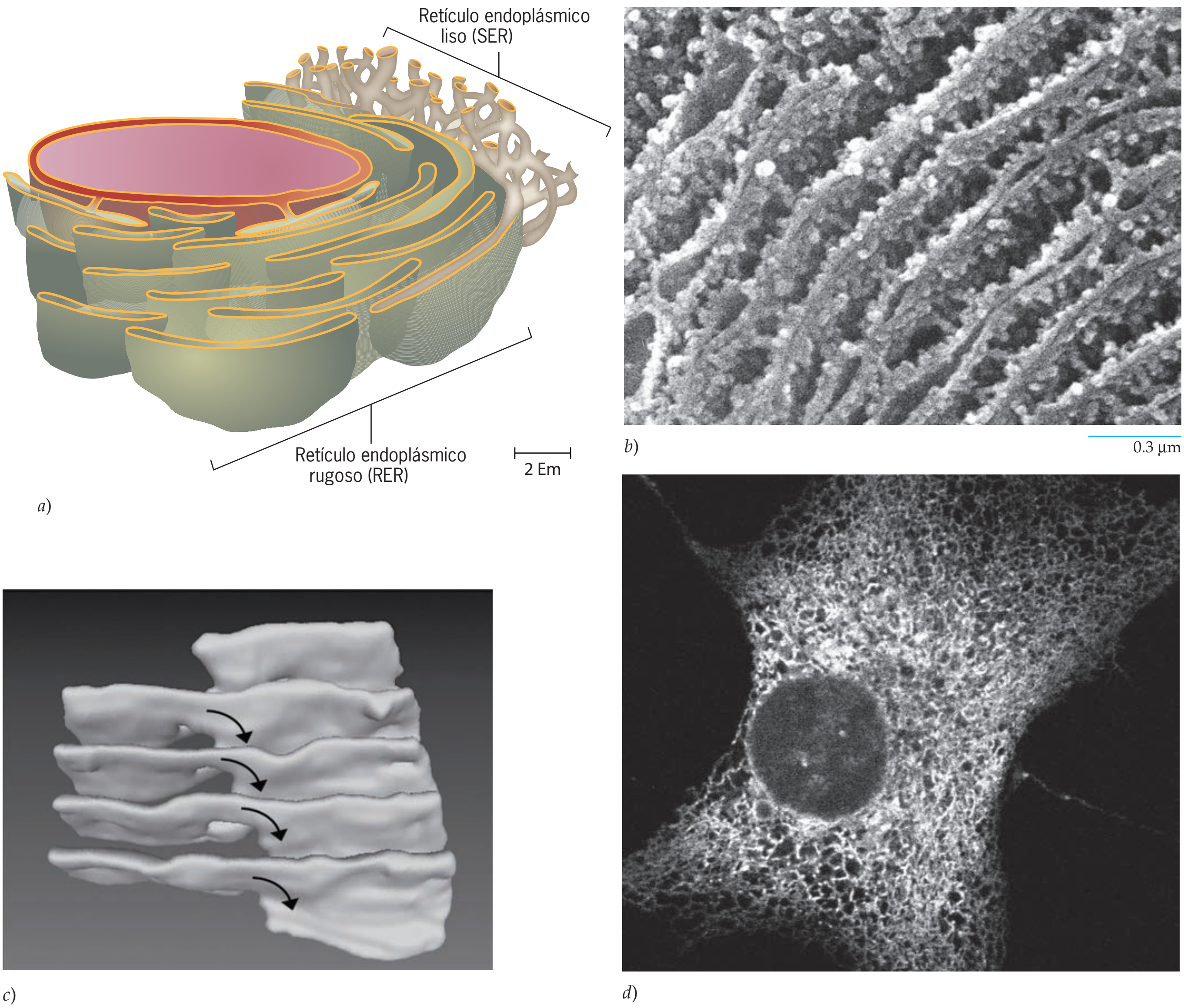



**FIGURA 8-9 El retículo endoplásmico rugoso (RER).** *a*) Diagrama esquemático que muestra las pilas de cisternas aplanadas que componen el ER rugoso. La superficie citosólica de la membrana ER contiene ribosomas unidos, lo que les da a las cisternas su apariencia rugosa. *b*) Micrografía electrónica de escaneo del ER rugoso en una célula acinar pancreática. *c*) La imagen EM de alta resolución ha revelado que las hojas del ER están conectadas por rampas helicoidales. Aquí se muestra una reconstrucción en 3D de dicha rampa. *d*) Visualización del ER en una célula de mamífero vivo cultivada completa como se revela por la fluorescencia de GFP de una proteína del ER.

FUENTE: *b*) Tomada de K. Tanaka. *Int Rev Cytol* 1980;68:101, cortesía de K. Tanaka; *c*) de Terasaki, *et al*. *Cell* 2013;154:285; *d*) de George H. Patterson. Archivo de imágenes de células, CIL721.

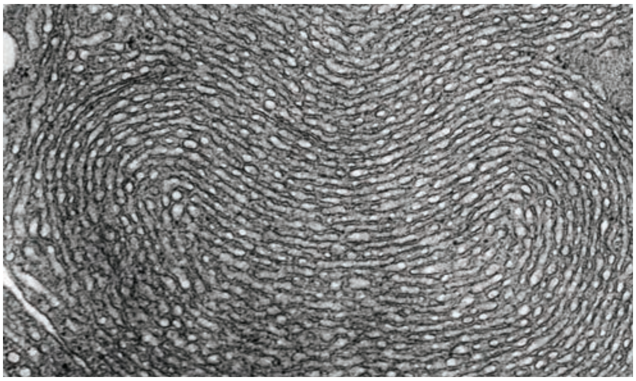


**FIGURA 8-10 El ER liso (SER).** Micrografía electrónica de una célula de Leydig del testículo que muestra el ER liso extenso donde se sintetizan las hormonas esteroideas.

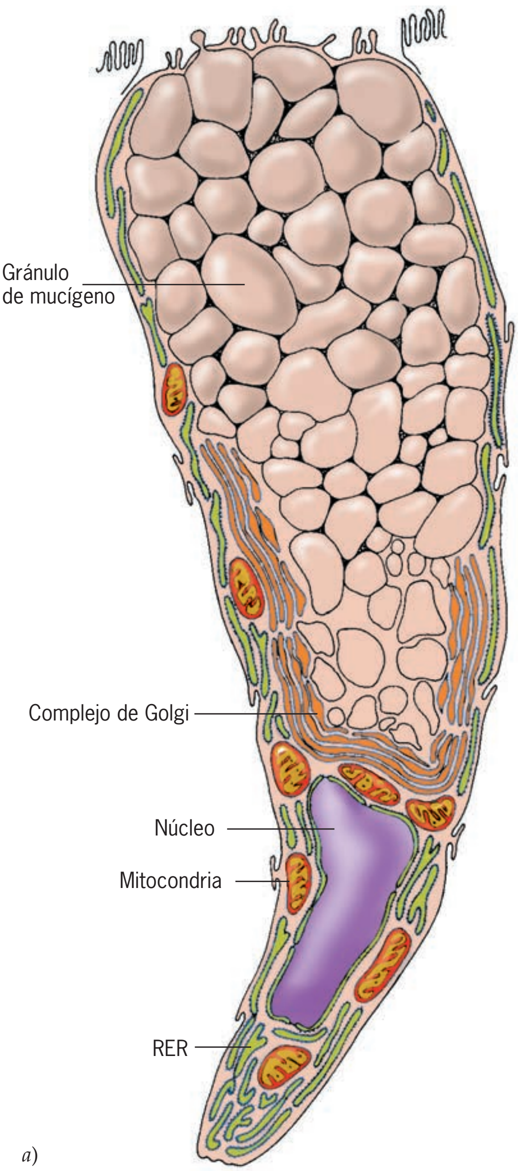
FUENTE: Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.

crónico puede conducir a la proliferación del SER en las células hepáticas. La desintoxicación se lleva a cabo mediante una colección de enzimas que transfieren oxígeno (oxigenasas), incluida la familia del *citocromo* P450. Estas enzimas son notables por su falta de especificidad de sustrato, pudiendo oxidar miles de compuestos hidrofóbicos diferentes y convertirlos en derivados más hidrófilos, que se excretan con mayor facilidad. Los resultados no siempre son positivos. Por ejemplo, existe el benzo[*a*]pireno compuesto relativamente inofensivo que se forma cuando la carne se carboniza en una parrilla y se convierte en un potente carcinógeno por las enzimas "desintoxicantes" del SER. El citocromo P450s metaboliza muchos medicamentos recetados, y la variación genética en estas enzimas entre los humanos puede explicar las diferencias de una persona a otra en la efectividad y los efectos secundarios de muchas drogas.

- Secuestro de iones de calcio dentro del citoplasma de las células. La liberación regulada de $Ca^{2+}$ del SER de las células del músculo esquelético y cardiaco (conocido como el *retículo sarcoplásmico* en las células musculares) desencadena la contracción.

## El retículo endoplásmico rugoso

Las primeras investigaciones sobre las funciones del RER se llevaron a cabo en células que secretan grandes cantidades de proteínas, como las células acinares del páncreas (figura 8-3) o las células que secretan mucosidad del revestimiento del tracto digestivo (**FIGURA 8-11**). Es evidente por el dibujo (figura 8-11*a*) y la micrografía (figura 8-11*b*) que los organelos de estas células secretoras



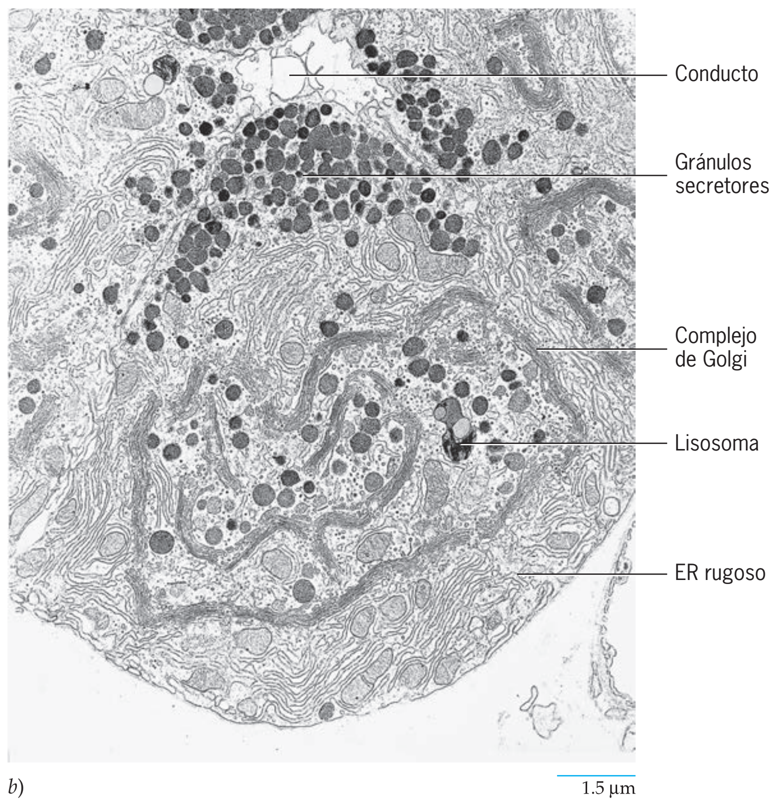




**FIGURA 8-11 Estructura polarizada de una célula secretora.** *a*) Dibujo de una célula caliciforme secretora de moco del colon de la rata. *b*) Micrografía electrónica de baja potencia de una célula secretora de moco de la glándula de Brunner del intestino delgado del ratón. Ambos tipos de células muestran una disposición claramente polarizada de organelos, lo que refleja su papel en la secreción de grandes cantidades de mucoproteínas. Los extremos basales de las células contienen el núcleo y el ER rugoso. Las proteínas sintetizadas en el ER rugoso se mueven al complejo de Golgi estrechamente asociado y de allí a los portadores unidos a la membrana en los que se concentra el producto secretor final. Las regiones apicales de las células se llenan con gránulos secretores que contienen las mucoproteínas listas para liberar en un conducto.

FUENTE: *a*) Tomada de Marian Neutra y C. P. Leblond, Copyright 1966, Rockefeller University Press. Publicada originalmente en *The Journal of Cell Biology. Volumen* 30: 119. *b*) De Alain Rambourg e Yves Clermont. *Eur J Cell Biol* 1990;51:196; © 1990, reimpreso con permiso de Elsevier.

epiteliales se colocan en la célula de una manera que produce una polaridad distinta de un extremo al otro. El núcleo y una amplia variedad de cisternas de RER se encuentran cerca de la superficie basal de la célula, que enfrenta el suministro de sangre. El complejo de Golgi se encuentra en la región central de la célula. La superficie apical de la célula se enfrenta a un conducto que transporta las proteínas secretadas fuera del órgano. El citoplasma en el extremo apical de la célula está lleno de gránulos secretores cuyos contenidos están listos para ser liberados en el conducto hasta la llegada de la señal apropiada. La polaridad de estas células epiteliales glandulares refleja el movimiento de las proteínas secretoras a través de la célula desde su sitio de síntesis hasta su sitio de descarga. El ER rugoso es el punto de partida de la vía biosintética: es el sitio de síntesis de las proteínas, las cadenas de carbohidratos y los fosfolípidos que viajan a través de los compartimientos membranosos de la célula.



**REPASO**

1. ¿Cuáles son las principales diferencias morfológicas entre el RER y el SER? ¿Cuáles son las principales diferencias en sus funciones?

## 8.4 Funciones del retículo endoplásmico rugoso

Las funciones del ER rugoso incluyen la síntesis de proteínas y la síntesis de la mayoría de los lípidos de las membranas celulares. La adición de azúcares a los residuos de asparagina de las proteínas comienza en el ER rugoso y continúa en el complejo de Golgi. Esta sección presentará el papel del ER en la síntesis de proteínas secretadas, proteínas lisosomales y proteínas integrales de membrana.

### Síntesis de proteínas en ribosomas ligados a membranas *versus* libres

El descubrimiento del retículo endoplásmico rugoso como el sitio de síntesis de las proteínas secretoras en las células acinares pancreáticas se describió antes (figura 8-3). Se encontraron resultados similares para otros tipos de células secretoras, incluidas las células caliciformes intestinales que secretan mucoproteínas, las células endocrinas que secretan hormonas polipeptídicas, las células plasmáticas que secretan anticuerpos y las células hepáticas que secretan proteínas séricas sanguíneas.

Experimentos adicionales revelaron que los polipéptidos se sintetizan en dos lugares distintos dentro de la célula.

1. Casi una tercera parte de las proteínas codificadas por un genoma de mamífero se sintetizan en ribosomas unidos a la superficie citosólica de las membranas del RER y se liberan en la luz del RE en un proceso llamado **translocación cotraduccional**. Estos incluyen *a*) proteínas secretadas, *b*) proteínas de membrana integrales y *c*) proteínas solubles que residen dentro de los compartimientos del sistema de endomembrana, que incluyen el ER, el complejo de Golgi, los lisosomas, los endosomas, las vesículas y las vacuolas de las plantas.
2. Otros polipéptidos se sintetizan en ribosomas "libres", es decir, en ribosomas que no están unidos al RER, y luego se liberan en el citosol. Esta clase incluye *a*) proteínas destinadas a permanecer en el citosol (como las enzimas de la glucólisis y las proteínas del citoesqueleto), *b*) proteínas periféricas de la superficie citosólica de las membranas (como las espectrinas y las ankirinas que están débilmente asociadas) con la superficie citosólica de la membrana plasmática), *c*) proteínas que se transportan al núcleo (sección 12.2) y *d*) proteínas que se incorporarán en los peroxisomas, cloroplastos y mitocondrias. Las proteínas en los dos últimos grupos se sintetizan hasta su finalización en el citosol y luego se importan *después de la traducción* en el organelo apropiado a través de su(s) membrana(s) límite (sección 8.21).

¿Qué determina la ubicación en una célula donde se sintetiza una proteína? A principios de la década de 1970, Günter Blobel, en colaboración con David Sabatini y Bernhard Dobberste en la Universidad Rockefeller, propuso por primera vez, y luego demostró, que el sitio de síntesis de una proteína está determinado por la secuencia de aminoácidos en la porción N-terminal del polipéptido, que es la primera parte que emerge del ribosoma durante la síntesis de proteínas. Ellos sugirieron lo siguiente:

1. Las proteínas secretoras contienen una **señal de secuencia** en su extremo-N que dirige el polipéptido y ribosoma emergentes a la membrana ER.
2. El polipéptido se mueve hacia el espacio cisternal del ER a través de una proteína alineada en un canal acuoso de la membrana del ER. Se propuso que el polipéptido se mueve a través de la membrana a medida que se sintetiza, es decir, de forma *simultánea a la traducción.*[2]

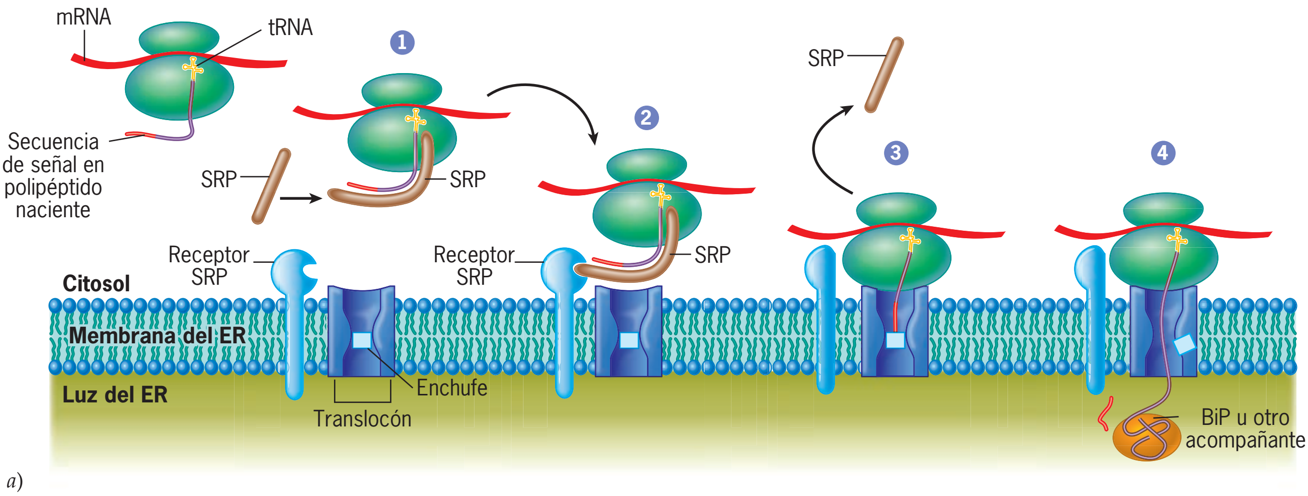
Esta propuesta, conocida como la *hipótesis de la señal*, ha sido corroborada por un gran cuerpo de evidencia experimental. Aún más importante, se ha demostrado que el concepto original de Blobel de que las proteínas contienen "códigos de dirección" incorporados se aplica en principio a prácticamente todos los tipos de vías de tráfico de proteínas en toda la célula.

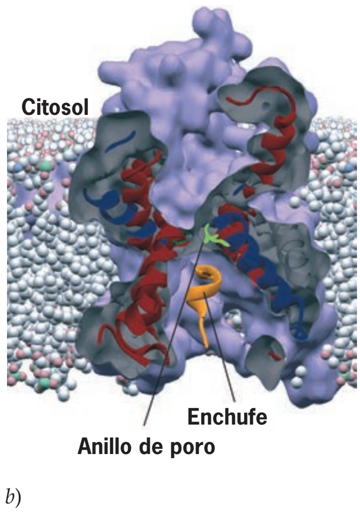
### Síntesis de proteínas secretoras, lisosomales o vacuolar de las plantas

La síntesis de las proteínas secretoras, lisosomales o vacuolares de las plantas se realiza por lo general mediante translocación translacional. En este proceso, las proteínas recién formadas se depositan en la luz del ER mediante un ribosoma que está unido a la membrana del ER (**FIGURA 8-12**). La síntesis del polipéptido comienza después de que un RNA mensajero se une a un ribosoma libre, es decir, uno que *no* está unido a una membrana citoplásmica. De hecho, se cree que todos los ribosomas son idénticos; los empleados en la síntesis de proteínas secretoras, lisosomales o vacuolares de las plantas no se distinguen de los utilizados para la producción de proteínas que permanecen en el citosol. Los polipéptidos que se someten a translocación translacional contienen una secuencia de señal —que típicamente incluye un tramo de 6-15 restos de aminoácidos hidrófobos— que dirige al polipéptido *naciente* a la membrana del ER y conduce a la compartimentación del polipéptido dentro de la luz del ER (un polipéptido *naciente* es aquel que está en el proceso de ser sintetizado.) Aunque la secuencia de señal normalmente se encuentra en o cerca del extremo N, ocupa una posición interna en algunos polipéptidos.

A medida que emerge del ribosoma, la secuencia de señal hidrofóbica es reconocida por una **partícula de reconocimiento de señal** (**SRP**, *signal recognition particle*), que consiste en células de mamífero de seis polipéptidos distintos y una molécula de RNA llamada RNA 7SL. El SRP se une tanto a la secuencia

[2] Debe notarse que el transporte de proteínas a través de la membrana ER también puede ocurrir después de la traducción (es decir, después de la síntesis). En este proceso, el polipéptido se sintetiza totalmente en el citosol y luego importado a la luz del ER a través de los mismos canales de conducción de proteína utilizados en la vía cotraduccional. La vía postraduccional se utiliza mucho más en levaduras que en células de mamíferos para su importación al ER. De hecho, las células de levadura que no pueden llevar a cabo el transporte de cotrasduccional al ER aún pueden sobrevivir, a pesar de que crecen a un ritmo más lento en comparación con las células normales.



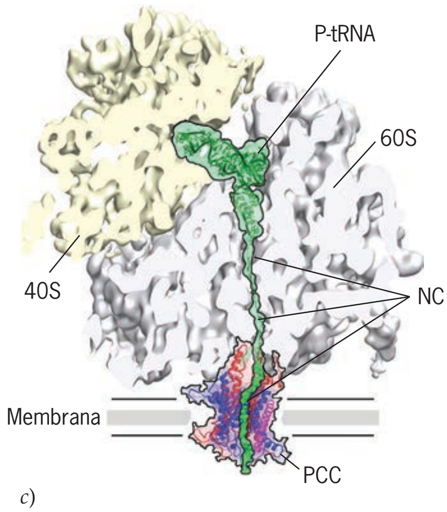




**FIGURA 8-12 Un modelo esquemático de la síntesis de una proteína secretora (o una enzima lisosomal) en un ribosoma del RER unido a la membrana.** *a*) La síntesis del polipéptido comienza en un ribosoma libre. A medida que la secuencia de señal (que se muestra en rojo) emerge del ribosoma, se une al SRP (paso 1), que encabeza la traducción hasta que el complejo SRP-ribosoma-cadena naciente puede entrar en contacto con la membrana del ER. El complejo SRP-ribosoma colisiona y se une a un receptor SRP (SR) situado dentro de la membrana del ER (paso 2). La unión de este complejo al receptor SRP es seguida por la liberación del SRP y la asociación del ribosoma con un translocón de la membrana del ER (paso 3). Estos últimos eventos están acompañados por la hidrólisis recíproca de moléculas de GTP (no mostradas) unidas tanto a la SRP como a su receptor. En el modelo representado aquí, el péptido señal se une luego al interior del translocón, desplazando el tapón del canal y permitiendo que el resto del polipéptido se transloque a través de la membrana cotraduccionalmente (paso 4). Después de que el polipéptido naciente pasa a la luz del ER, el péptido señal se escinde mediante una proteína de membrana (la peptidasa señal, no mostrada), y la proteína se somete a plegamiento con la ayuda de chaperonas del ER, como BiP. Los estudios sugieren que los translocones se organizan en grupos de dos o cuatro unidades en lugar de ser individualmente como se muestra aquí. *b*) Vista en sección transversal del canal de translocón desde el lado basado en la estructura cristalina de rayos X de un translocón bacteriano de archaebacteria. La forma del reloj de arena del canal acuoso y su tapón helicoidal son evidentes. También se muestra el anillo de cadenas laterales hidrofóbicas (verde) situado en el sitio más estrecho dentro del canal. *c*) Representación de un complejo ribosoma-translocón en el acto de síntesis y translocación de una proteína naciente basada en cryo-EM (sección 18.14). Se ve que el canal de salida dentro del ribosoma está alineado con el canal conductor dentro del translocón. PCC (*protein conducting channel*): canal de conducción de proteínas; NC (*nascent chain*): cadena naciente; P-tRNA (*peptidil-t-RNA*): peptidil-t-RNA; 40S y 60S: subunidades ribosómicas.

FUENTE: *b*) Reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd: Tom A. Rapoport. *Nature* 2007;450:664; © Copyright 2007. *c*) Tomada de Thomas Becker, *et al*. *Science* 2009;Vol326:1372, figura 6e. Roland Beckmann, Universidad de Munich. Reproducida con permiso de AAAS.

de señal en el polipéptido naciente y el ribosoma (paso 1, figura 8-12*a*), deteniendo por un tiempo la síntesis adicional del polipéptido. El complejo polipeptídico SRP-ribosoma-naciente se recluta luego a la membrana del ER a través de una interacción entre el SRP y el **receptor SRP** en la membrana del ER (paso 2). El ribosoma (con su polipéptido naciente) se transfiere del SRP al **translocón** (paso 3). El translocón es un canal de proteína incrustado en la membrana del ER a través del cual el polipéptido naciente puede moverse en su paso del ribosoma a la luz del ER.

La cristalografía de rayos X del translocón (figura 8-12*b*) ha proporcionado información sobre cómo se produce la translocación. Estos estudios han revelado la presencia dentro del translocón de un poro en la forma de un reloj de arena con un anillo de seis aminoácidos hidrofóbicos situados en su diámetro más estrecho. En el estado inactivo (es decir, no translocado), la abertura en el anillo del poro está tapada por una hélice corta α. Se pensó que este tapón es para sellar el canal, evitando el paso no deseado de calcio y otros iones entre el citosol y la luz del ER.

Tras la unión del ribosoma al translocón, se reconoce la secuencia de señal, y el polipéptido naciente se inserta en el canal acuoso estrecho del translocón (etapa 3). Se propone que el contacto de la secuencia de señal con el interior del translocón conduce al desplazamiento del tapón y a la apertura del conducto. El polipéptido en crecimiento se transloca entonces a través del anillo de poros hidrofóbico y hacia la luz del ER (etapa 4 y figura 8.12*c*). Debido a que el anillo de poro observado en la estructura

cristalina tiene un diámetro (5-8 Å) que es mucho más pequeño que el de una cadena de polipéptido helicoidal, se cree que el canal puede abrirse en forma de bisagra cuando la cadena naciente atraviesa el canal. Tras finalizar la traducción y el paso del polipéptido completado a través del translocón, el ribosoma unido a la membrana se libera de la membrana del ER y el tapón helicoidal se reinserta en el canal de translocón.



Varios de los pasos implicados en la síntesis y el tráfico de proteínas secretoras están regulados por la unión o hidrólisis de GTP. Como se discutirá en detalles en el capítulo 15 y en otras partes de este capítulo, las **proteínas GTP unidas** (o **proteínas G**) desempeñan funciones reguladoras clave en muchos procesos celulares diferentes.[3] Las proteínas G pueden estar presentes en al menos dos conformaciones alternativas, una que contiene una molécula de GTP unida y la otra una molécula de GDP unida. Las versiones unidas a GTP y unidas a GDP de una proteína G tienen diferentes conformaciones y, por tanto, tienen diferentes capacidades para unirse a otras proteínas. Debido a esta diferencia en las propiedades de unión, las proteínas G actúan como "interruptores moleculares"; la proteína unida a GTP-típicamente activa el proceso, y la hidrólisis del GTP unido la desactiva. Entre los componentes representados en la figura 8-12, tanto el SRP como el receptor SRP son proteínas G que interactúan entre sí en sus estados unidos a GTP. La evidencia reciente ha demostrado que, justo antes de la hidrólisis de GTP, el complejo de proteína G sufre un cambio conformacional dramático que de manera simultánea expone la secuencia de señal y deja espacio para que el translocón se una al ribosoma. La hidrólisis de GTP unido a estas dos proteínas desencadena la liberación de la secuencia de señal por el SRP.

## Procesamiento de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico

A medida que ingresa al RER cisterna, un polipéptido naciente actúa sobre una variedad de enzimas ubicadas dentro de la membrana o en la luz del RER. La porción *N*-terminal que contiene el péptido señal se elimina de la mayoría de los polipéptidos nacientes mediante una enzima proteolítica, la **señal peptidasa**. Los carbohidratos se agregan a la proteína naciente mediante la enzima *oligosacariltransferasa* (discutida en la sección 8.6). Tanto la señal peptidasa como la oligosacariltransferasa son proteínas de membrana integrales asociadas con el translocón que actúan sobre las proteínas nacientes cuando ingresan en la luz del RE.

El RER es una importante planta de procesamiento de proteínas. Para cumplir con sus obligaciones, la luz del RER está repleta de chaperonas moleculares que reconocen y se unen a proteínas desplegadas o mal plegadas y les dan la oportunidad de alcanzar su estructura tridimensional (nativa) correcta (sección 8.7). La luz del ER también contiene una serie de enzimas que procesan proteínas, como la *proteína disulfuro isomerasa* (PDI, *protein disulfide isomerase*). Las proteínas entran en la luz del ER con sus residuos de cisteína en el estado reducido (—SH), pero salen del compartimiento con muchos de estos residuos unidos entre sí como disulfuros oxidados (—SS—) (p. 50). La formación (y reordenamiento) de enlaces disulfuro está catalizada por PDI. Los enlaces disulfuro realizan un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad de las proteínas que están presentes en la superficie extracelular de la membrana plasmática o se secretan en el espacio extracelular.

El retículo endoplásmico está idealmente construido por su papel como portador de entrada para la ruta biosintética de la célula. Su membrana proporciona una gran área de superficie a la que se pueden unir muchos ribosomas (un estimado de 13 millones por célula hepática). La luz de la cisterna del ER proporciona un entorno local especializado que favorece la modificación, el plegamiento y el ensamblaje de un subconjunto seleccionado de las proteínas de la célula. La segregación de estas proteínas recién sintetizadas en las cisternas del ER las elimina del citosol y les permite ser modificadas y enviadas a su destino final, ya sea fuera de la célula o dentro de uno de los organelos membranosos del citoplasma.

[3] Las proteínas GTP por lo general requieren proteínas accesorias para llevar a cabo su función. Los roles de estas proteínas se discuten en el capítulo 15 y se ilustran en la figura 15-21. No serán considerados en el presente capítulo, a pesar de que están involucrados en estas actividades.

## Síntesis de proteínas integrales de membranas en ribosomas unidos al ER

Las proteínas integrales de membrana, además de las mitocondrias y los cloroplastos, también se sintetizan mediante translocación translacional utilizando la misma maquinaria descrita para la síntesis de proteínas secretoras y lisosomales (figura 8-12). Sin embargo, a diferencia de las proteínas secretoras y lisosomales solubles, que pasan a través de la membrana del ER durante la translocación, las proteínas integrales contienen uno o más segmentos transmembrana hidrofóbicos (p. 127) que se derivan directamente del canal del translocón a la bicapa lipídica. ¿Cómo puede llevarse a cabo tal transferencia?

Los estudios cristalográficos de rayos X del translocón antes descritos mostraron que el translocón tiene una conformación en forma de almeja con una ranura o costura a lo largo de un lado de la pared donde el canal podría abrirse y cerrarse. A medida que un polipéptido pasa a través del translocón, se propone que esta "puerta" lateral en el canal se abra continuamente y se cierra, lo que da a cada segmento del polipéptido naciente una oportunidad de partirse de acuerdo con sus propiedades de solubilidad en el compartimiento acuoso dentro del canal translocón o en el núcleo hidrofóbico circundante de la bicapa lipídica. Esos segmentos del polipéptido naciente que son suficientemente hidrófobos se "disolverán" de modo espontáneo en la bicapa lipídica hasta convertirse en segmentos transmembranales de una proteína integral de membrana. Este concepto ha recibido un fuerte apoyo de un estudio *in vitro* en el que a los translocones se les dio la oportunidad de translocar proteínas nacientes diseñadas a medida que contenían segmentos de prueba de hidrofobicidad variable. Cuanto más hidrofóbico es el segmento de prueba, mayor es la probabilidad de que pase a través de la pared del translocón y se integre como un segmento transmembrana de la bicapa.

La **FIGURA 8-13** muestra la síntesis de un par de proteínas integrales de membrana que contienen un único segmento transmembrana. Las proteínas de membrana de expansión simple pueden tener una orientación con su extremo N orientado hacia el citosol o la luz del RE (y eventualmente hacia el espacio extracelular). Como se señaló en la página 128, el determinante más común de la alineación de proteínas de la membrana es la presencia de residuos de aminoácidos cargados positivamente que flanquean el extremo citosólico de un segmento transmembrana (véase figura 4-18). Durante la síntesis de las proteínas de membrana, se piensa que el revestimiento interior del translocón orientará al polipéptido naciente, como se indica en la figura 8-13, de modo que el extremo más positivo quede frente al citosol. En las proteínas de expansión múltiple (como se muestra en la figura 4-32*d*), los segmentos transmembrana secuenciales tienen típicamente orientaciones opuestas. Para estas proteínas, su disposición en la membrana está determinada por la dirección en la que se inserta el primer segmento transmembrana. Una vez que esto ha sido determinado, cada otro segmento transmembrana debe rotarse 180° antes de que pueda salir del translocón. Los estudios realizados con componentes purificados en sistemas libres de células sugieren que un translocón, por sí mismo, es capaz de orientar correctamente los segmentos transmembrana. Parece que el translocón es más que un simple pasaje a través de la membrana del ER; es una máquina compleja capaz de reconocer varias secuencias de señal y realizar actividades mecánicas complejas.

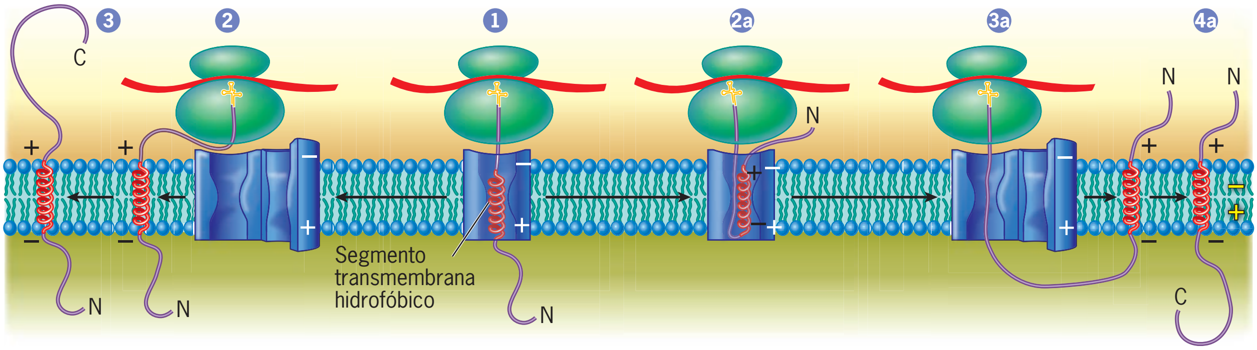



**FIGURA 8-13 Un modelo esquemático para la síntesis de una proteína integral de membrana** que contiene un único segmento transmembrana cerca del extremo N del polipéptido naciente. El SRP y los diversos componentes de la membrana que se muestran en la figura 8-12 también están implicados en la síntesis de proteínas integrales, pero se han omitido por simplicidad. El polipéptido naciente ingresa al translocón como si fuera una proteína secretora (paso 1). Sin embargo, la entrada de la secuencia transmembrana hidrofóbica en el poro bloquea la posterior translocación del polipéptido naciente a través del canal. Los pasos 2-3 muestran la síntesis de una proteína transmembrana cuyo extremo N se encuentra en la luz del ER y el extremo C está en el citosol. En el paso 2, la puerta lateral del translocón se ha abierto y expulsado el segmento transmembrana en la bicapa. El paso 3 muestra la disposición final de la proteína. Los pasos 2a-4a muestran cómo la síntesis de una proteína transmembrana cuyo terminal C se encuentra en la luz y el terminal N está en el cistosol. En el paso 2a, el translocón ha reorientado el segmento transmembrana, de acuerdo con sus flancos cargados invertidos positiva y negativamente. En la etapa 3a, el translocón se ha abierto de forma lateral y ha expulsado el segmento transmembrana hacia la bicapa. El paso 4a muestra la disposición final de la proteína. Los signos de color blanco + y – indican la carga propuesta mostrada por el revestimiento interior del translocón. También se cree que la diferencia de carga entre los fosfolípidos de las valvas citosólica y de la luz de la bicapa (indicada por los signos amarillo + y –) desempeña un papel en la determinación de la topología de la proteína de la membrana. Los segmentos transmembrana se muestran como hélices sobre la base de estudios que indican que estas regiones adoptan una estructura secundaria helicoidal dentro del túnel de salida ribosómico antes de que entren en el translocón.

En los últimos años, se han encontrado nuevas clases de proteínas transmembrana que puentean el translocón. Una de esas clases de proteínas, llamadas *proteínas ancladas*, carece de una secuencia de señal, pero no obstante logran insertarse de forma adecuada en la membrana del ER. Estas proteínas se sintetizan en el citoplasma y se dirigen al ER a través de una serie de interacciones con las proteínas en la vía Get (entrada guiada de las proteínas ancladas).

## REPASO

1. Describa los pasos que ocurren entre el momento en que un ribosoma se une a un RNA mensajero que codifica una proteína secretora y el momento en que la proteína abandona el RER.
2. ¿Cómo se insertan las proteínas integradas recientemente sintetizadas en una membrana?

## 8.5 Biosíntesis de membrana en el retículo endoplásmico

Las membranas no surgen por primera vez, es decir, como nuevas entidades a partir de grupos de proteínas y lípidos que se mezclan. En cambio, las membranas surgen de membranas preexistentes. Las membranas crecen como proteínas recién sintetizadas, y los lípidos se insertan en las membranas existentes en el retículo endoplásmico (ER). Como será evidente en la siguiente discusión, los componentes de la membrana se mueven desde el ER a prácticamente cualquier otro compartimiento en la célula. A medida que la membrana se mueve de un compartimiento al siguiente, sus proteínas y lípidos son modificados por las enzimas que residen en los diversos organelos de la célula. Estas modificaciones contribuyen a dar a cada compartimiento de membrana una composición única y una identidad distinta.

Tenga en cuenta que las membranas celulares son asimétricas: las dos capas de fosfolípidos (folíolos) de una membrana tienen diferentes composiciones (página 121). Esta asimetría se establece en un inicio en el retículo endoplásmico. La asimetría se mantiene a medida que los portadores de membrana brotan de un compartimiento y se fusionan al siguiente. Como resultado, los dominios situados en la superficie citosólica de la membrana del ER pueden identificarse en la superficie citosólica de las vesículas de transporte, la superficie citosólica de las cisternas de Golgi y la superficie interna (citoplásmica) de la membrana plasmática (**FIGURA 8-14**). De manera similar, los dominios situados

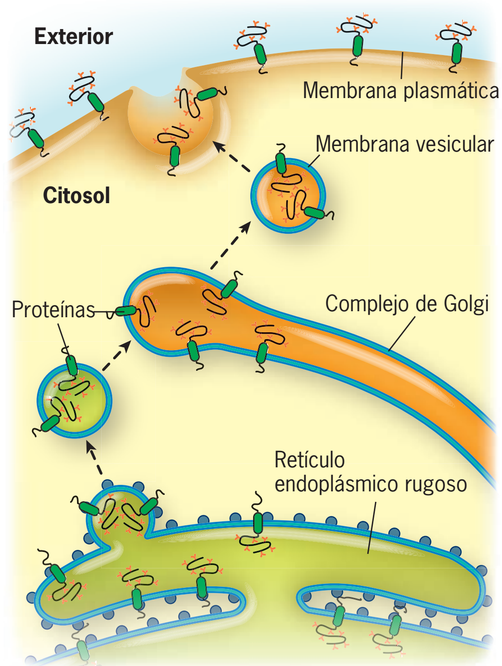



**FIGURA 8-14 Mantenimiento de la asimetría de la membrana.** Como cada proteína se sintetiza en el RE rugoso, se inserta en la bicapa lipídica en una orientación predecible determinada por su secuencia de aminoácidos. Esta orientación se mantiene durante sus viajes en el sistema de endomembrana, como se ilustra en esta figura. Las cadenas de carbohidratos, que se agregan por primera vez en el ER, proporcionan una manera conveniente de evaluar la posición de la membrana porque siempre están presentes en el lado cisternal del citoplasma después de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática.

en la superficie de la luz de la membrana del ER mantienen su orientación y se encuentran en la superficie externa (exoplasmática) de la membrana plasmática. De hecho, de muchas maneras, incluyendo su alta concentración de calcio y la abundancia de proteínas con enlaces disulfuro y cadenas de carbohidratos, la luz del ER (así como otros compartimientos de la vía secretora) se parece mucho al espacio extracelular.

La mayoría de los lípidos de la membrana se sintetizan por completo dentro del retículo endoplásmico. Las principales excepciones son 1) esfingomielina y glucolípidos, cuya síntesis comienza en el ER y se completa en el complejo de Golgi, y 2) algunos de los lípidos únicos de las membranas mitocondriales y cloroplástica, que son sintetizados por enzimas que residen en esas membranas. Las enzimas que participan en la síntesis de fosfolípidos son en sí mismas proteínas integrales de la membrana del ER con sus sitios activos frente al citosol.

Los fosfolípidos recién sintetizados se insertan en la mitad de la bicapa mirando al citosol. Algunas de estas moléculas de lípidos son luego volteadas en la valva opuesta a través de la acción de las enzimas llamadas *flipasas*. Los lípidos se transportan desde el ER al complejo de Golgi y a la membrana plasmática como parte de la bicapa que forma las paredes de las vesículas de transporte.

Las membranas de diferentes organelos tienen una composición lipídica marcadamente diferente (**FIGURA 8-15*a***), que indica que los cambios tienen lugar a medida que la membrana fluye a través de la célula. Varios factores pueden contribuir a dichos cambios (figura 8-15*b*):

1. La mayoría de los organelos membranosos contienen enzimas que modifican lípidos ya presentes en una membrana, convirtiendo un tipo de fosfolípido (p. ej., fosfatidilserina) en otro (p. ej., fosfatidil colina) (paso 1, figura 8-15*b*).
2. Cuando las vesículas brotan de un compartimiento (como en la figura 8-2*a*), algunos tipos de fosfolípidos pueden incluirse preferentemente dentro de la membrana de la vesícula formadora, mientras que otros tipos pueden dejarse atrás (paso 2, figura 8-15*b*).
3. Las células contienen **proteínas de transferencia** de lípidos que pueden unir y transportar *lípidos a través del citosol* acuoso desde un compartimiento de membrana a otro (paso 3, figura 8-15*b*). Estas proteínas facilitan el movimiento de lípidos específicos desde el ER a otros organelos sin la participación de vesículas de transporte. Se cree que la transferencia de lípidos ocurre en sitios donde el ER se encuentra muy cerca de la membrana externa de otros organelos.

## REPASO

1. Describa algunas de las formas en que los organelos membranosos pueden mantener sus composiciones únicas a pesar del tráfico continuo de membranas y materiales que se mueven a través de ellos.
2. Describa cómo se mantiene la asimetría de la membrana a medida que se mueve desde el ER a la membrana plasmática.

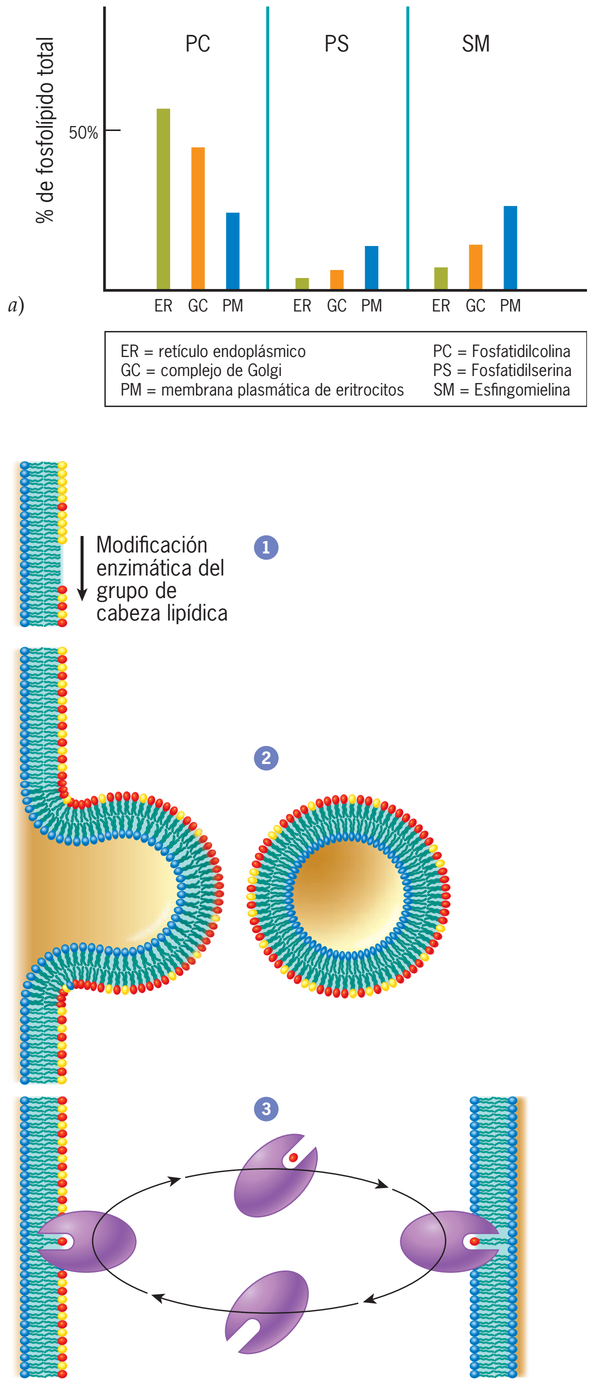



**FIGURA 8-15 Modificación de la composición lipídica de las membranas.** *a*) Histograma que indica el porcentaje de cada uno de los tres fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina) en tres membranas celulares diferentes (ER, complejo de Golgi y membrana plasmática). El porcentaje de cada lípido cambia de manera gradual a medida que la membrana fluye desde el ER al Golgi hacia la membrana plasmática. *b*) Diagrama esquemático que muestra tres mecanismos distintos que podrían explicar cómo la composición de fosfolípidos de una membrana en el sistema de endomembrana puede ser diferente de otra membrana en el sistema, aunque los compartimientos membranosos son espacial y temporalmente continuos. 1) Los grupos de cabeza de fosfolípidos de la bicapa se modifican enzimáticamente; 2) la membrana de una vesícula formadora contiene una composición de fosfolípidos diferente de la membrana desde la que brota; 3) los lípidos pueden eliminarse de una membrana e insertarse en otra membrana mediante proteínas de transferencia de lípidos.

## 8.6 Glucosilación en el retículo endoplásmico rugoso

Casi todas las proteínas producidas en los ribosomas unidos a la membrana, ya sean componentes integrales de una membrana, enzimas solubles lisosomales o vacuolares, o partes de la matriz extracelular, se convierten en glucoproteínas. Los grupos de hidratos de carbono tienen funciones clave en la función de muchas glucoproteínas, particularmente como sitios de unión en sus interacciones con otras macromoléculas, como ocurre durante muchos procesos celulares. También ayudan a doblar y estabilizar de modo adecuado la proteína a la que están unidos. Las secuencias de azúcares que comprenden los oligosacáridos de las glucoproteínas son altamente específicas; si los oligosacáridos se aíslan de una proteína purificada de un tipo dado de célula, su secuencia es consistente y predecible. ¿Cómo se logra el orden de los azúcares en los oligosacáridos?

La adición de azúcares a una cadena de oligosacáridos está catalizada por una gran familia de enzimas unidas a la membrana llamadas **glucosiltransferasas**. Cada una de estas enzimas transfiere un monosacárido específico de un azúcar nucleotídico, como GDP-manosa o UDP-*N*-acetilglucosamina (**FIGURA 8-16**), al extremo creciente de la cadena de carbohidratos. La secuencia en la que se transfieren los azúcares durante el ensamblaje de un oligosacárido depende de la secuencia de acción de las glucosiltransferasas que participan en el proceso. Esto a su vez depende de la ubicación de enzimas específicas dentro de las diversas membranas de la vía secretora. Por tanto, la disposición de azúcares en las cadenas de oligosacáridos de una glucoproteína depende de la localización espacial de enzimas particulares en la línea de ensamblaje.

Los pasos iniciales en el ensamblaje de oligosacáridos enlazados a *N* (en oposición a los oligosacáridos enlazados a *O*, véase figura 4-11) de las proteínas solubles y de las proteínas integrales de membrana se muestran en la figura 8-16. El segmento basal, o central, de cada cadena de carbohidratos no se ensambla en la proteína en sí, sino que se junta de forma independiente en un vehículo lipídico y luego se transfiere, como un bloque, a residuos específicos de asparagina del polipéptido. Este transportador de lípidos, que se llama **dolicol fosfato**, está incrustado en la membrana del ER. Los azúcares se añaden a la molécula de dolicol

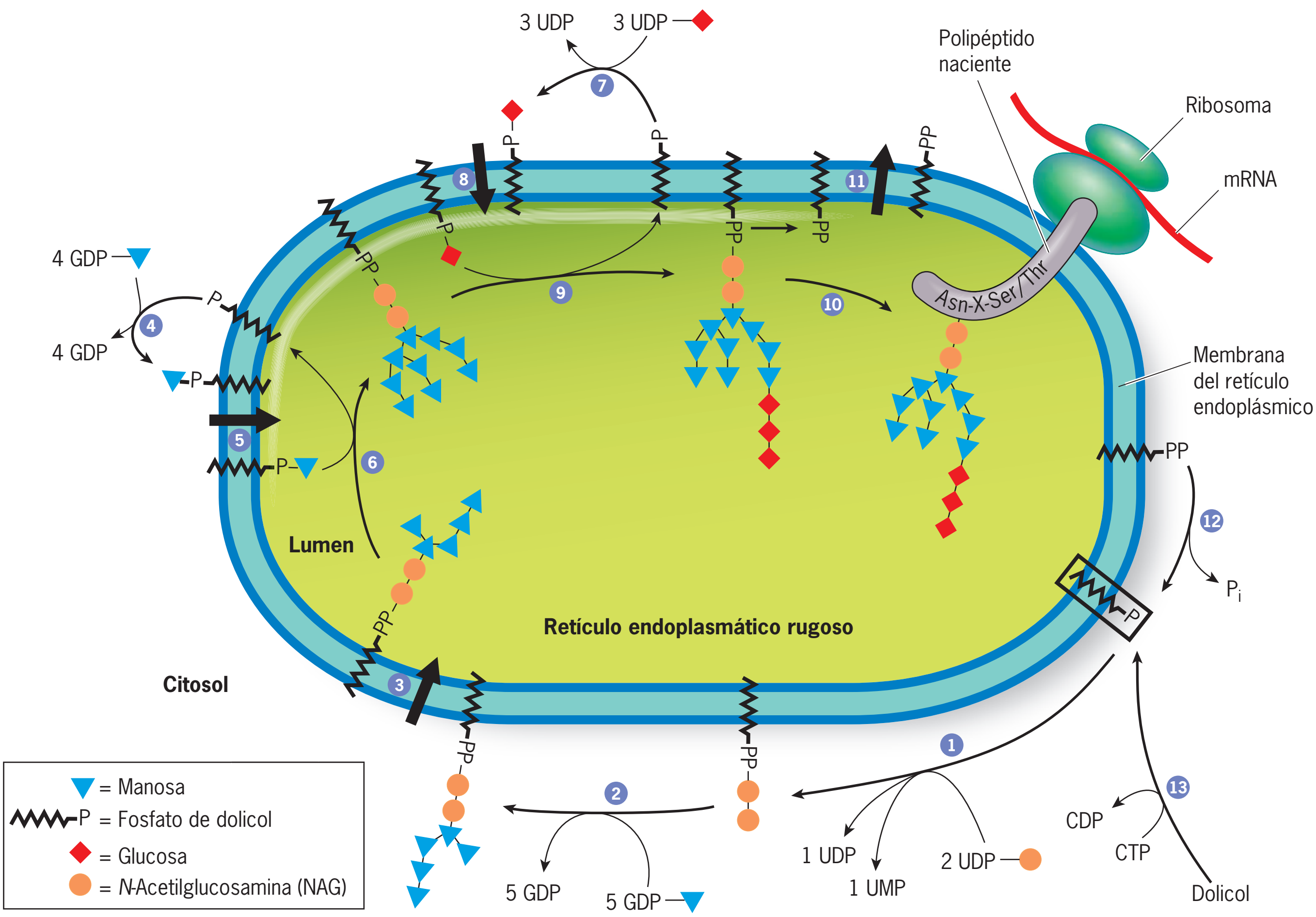



**FIGURA 8-16 Pasos en la síntesis de la parte del núcleo de un oligosacárido con enlace *N* en la ER aproximada**. Los primeros siete azúcares (cinco manosa y dos residuos de NAG) se transfieren de uno en uno al dolicol-PP en el lado citosólico de la membrana del RE (pasos 1 y 2). En esta etapa, el dolicol, con su oligosacárido unido, se voltea a través de la membrana (paso 3), y los azúcares restantes (cuatro manosa y tres residuos de glucosa) se unen en el lado luminal de la membrana. Estos últimos azúcares se unen uno por uno en el lado citosólico de la membrana al extremo de una molécula de fosfato de dolicol (como en los pasos 4 y 7), que luego pasa a través de la membrana (pasos 5 y 8) y dona su azúcar al extremo creciente de la cadena de oligosacáridos (pasos 6 y 9). Una vez que el oligosacárido está completamente ensamblado, se transfiere enzimáticamente a un residuo de asparagina (dentro de la secuencia N-X-S / T) del polipéptido naciente (paso 10). El dolicol-PP se voltea hacia atrás a través de la membrana (paso 11) y está listo para comenzar a aceptar nuevamente los azúcares (pasos 12 y 13).

FUENTE: Tomado de Voet D. y Voet J. G. *Biochemistry*. 2 ed., John Wiley & Sons, Inc.; Copyright 1995. Reimpreso con permiso de John Wiley & Sons, Inc.

fosfato a la vez mediante glucosiltransferasas ligadas a la membrana, comenzando con el paso 1 de la figura 8-16. Esta parte del proceso de glucosilación es invariable en lo fundamental; en las células de mamíferos, comienza con la transferencia de *N*-acetilglucosamina 1-fosfato, seguido de la transferencia de otra *N*-acetilglucosamina, luego nueve manosa y tres unidades de glucosa en el patrón preciso indicado en la figura 8-16. Este bloque previamente ensamblado de 14 azúcares es luego transferido por la enzima del ER oligosacariltransferasa desde el dolicol fosfato a ciertas asparginas en el polipéptido naciente (paso 10, figura 8-16) a medida que el polipéptido se transloca en la luz del ER.

Las mutaciones que conducen a la ausencia total de *N*-glucosilación provocan la muerte de los embriones antes de la implantación. Sin embargo, las mutaciones que conducen a una interrupción parcial de la vía de glucosilación en el ER son responsables de trastornos hereditarios graves que afectan a casi todos los sistemas orgánicos. Estas enfermedades se llaman enfermedades congénitas de la glucosilación o CDG (*congenital diseases of glycosylation*) y generalmente se identifican a través de análisis de sangre que detectan la glucosilación anormal de las proteínas séricas. Una de estas enfermedades, CDG1b, puede manejarse a través de un tratamiento notablemente simple. La CDG1b resulta de la deficiencia de la enzima fosfomanosa isomerasa, que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a manosa 6-fosfato, una reacción crucial en la ruta que hace que la manosa esté disponible para su incorporación en los oligosacáridos.

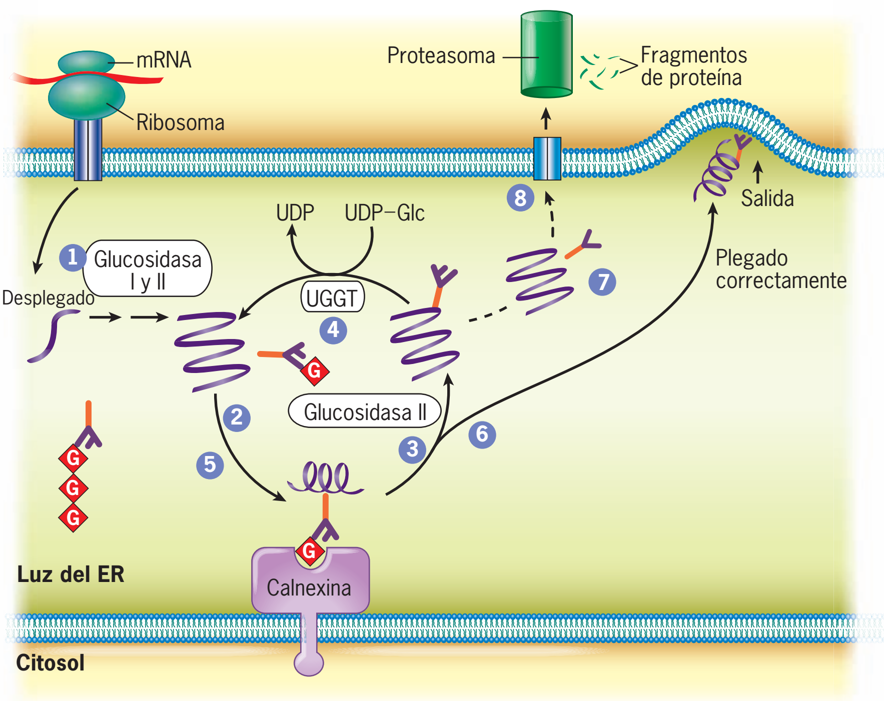



**FIGURA 8-17 Control de calidad: garantizar que las proteínas mal plegadas no avancen.** Sobre la base de este mecanismo propuesto, las proteínas mal plegadas son reconocidas por una glucosiltransferasa (UGGT) que agrega una glucosa al final de las cadenas de oligosacáridos. Las glucoproteínas que contienen oligosacáridos monoglucosilados son reconocidas por la chaperona calnexina unido a la membrana y se les da la oportunidad de lograr su estado plegado de forma correcta (nativo). Si eso no ocurre después de repetidos intentos, la proteína se disloca en el citosol y se destruye. Los pasos se describen en el texto. Una chaperona soluble (calreticulina) participa en esta misma vía de control de calidad.

FUENTE: L. Ellgaard, *et al. Science* 1999;286:984; copyright 1999, reimpreso con permiso de AAAS.

La enfermedad se puede tratar proporcionando a los pacientes suplementos orales de manosa. El tratamiento se probó por primera vez en un niño que estaba falleciendo por hemorragia gastrointestinal no controlada, una de las complicaciones habituales de la enfermedad. A los pocos meses de tomar suplementos de manosa, el niño estaba viviendo una vida normal.

Poco después de que se transfiere al polipéptido naciente, la cadena de oligosacáridos experimenta un proceso de modificación gradual. Esta modificación comienza en el ER con la eliminación enzimática de dos de los tres residuos terminales de glucosa (paso 1, **FIGURA 8-17**). Esto prepara el escenario para un evento importante en la vida de una glucoproteína recién sintetizada en la que se criba mediante un sistema de **control de la calidad** que determina si es apto para pasar al siguiente compartimiento de la ruta biosintética. Para comenzar este proceso de selección, cada glucoproteína, que en esta etapa contiene una sola glucosa restante, se une a una chaperona del ER (calnexina o calreticulina) (paso 2). La eliminación de la glucosa restante por la glucosidasa II conduce a la liberación de la glucoproteína de la chaperona (paso 3). Si una glucoproteína en esta etapa no ha completado su plegamiento o se ha plegado erróneamente, es reconocida por una enzima que confirma la conformación (llamada UGGT) que agrega un único residuo de glucosa a uno de los residuos de manosa en el extremo expuesto del oligosacárido recortado recientemente (paso 4). La UGGT reconoce proteínas completamente plegadas o mal plegadas, ya que muestran residuos hidrofóbicos expuestos que están ausentes de las proteínas plegadas de forma correcta. Una vez que se ha agregado el residuo de glucosa, la misma glucoproteína "marcada" es reconocida por las mismas chaperonas del ER, lo que le da a la proteína otra posibilidad de plegarse de modo correcto (paso 5). Después de un tiempo con la chaperona, se elimina el residuo de glucosa agregado y la enzima de detección de conformación lo comprueba otra vez para ver si ha alcanzado su estructura tridimensional adecuada. Si aún está parcialmente desplegada o mal plegada, se agrega otro residuo de glucosa y el proceso se repite hasta que la glucoproteína se haya plegado de forma correcta y continúe su camino (paso 6) o se haya perdido y se destruya. Los estudios sugieren que la "decisión" de destruir la proteína defectuosa comienza con la actividad de una enzima de acción lenta en el ER que recorta un residuo de manosa de un extremo expuesto del oligosacárido de una proteína que ha estado en el ER durante un periodo prolongado. Una vez que se han eliminado uno o más de estos residuos de manosa (paso 7), la proteína ya no se puede reciclar y, en cambio, se condena a la degradación (paso 8).

Retomaremos la historia de la glucosilación de proteínas en la página 278, donde el oligosacárido que se ensambla en el ER se agranda a medida que pasa a través del complejo de Golgi en su recorrido a través de la ruta biosintética.

## REPASO

1. Describa cómo los oligosacáridos ligados a N se ensamblan en proteínas blanco.
2. Describa los pasos de control de la calidad que tienen lugar en el RER para garantizar que las glucoproteínas se plieguen de forma correcta.

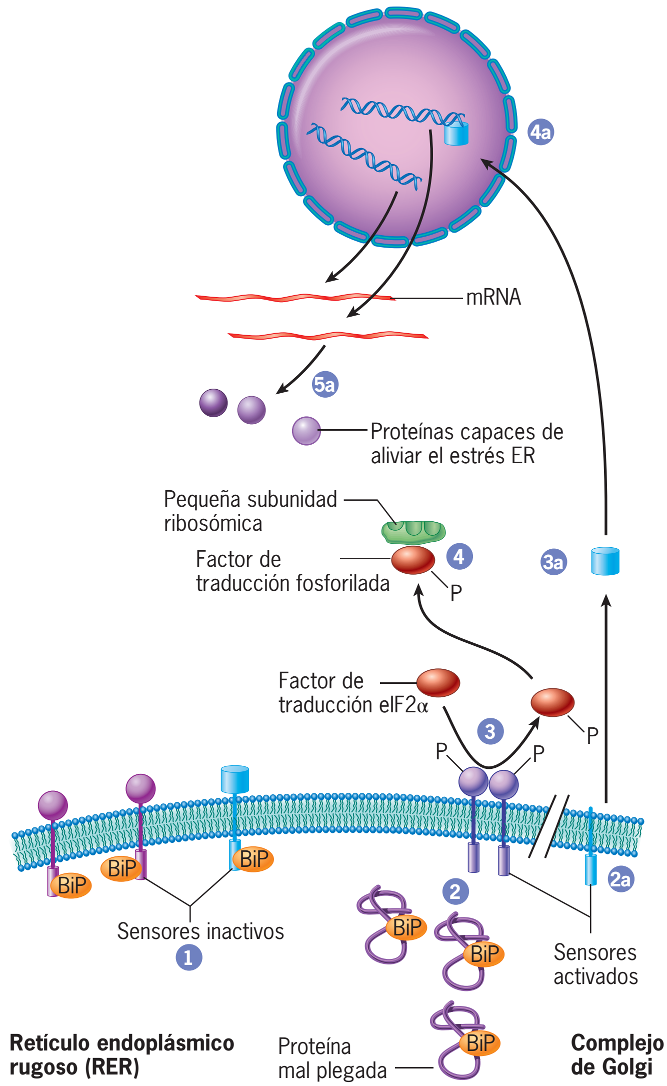



**FIGURA 8-18 Un modelo de la respuesta de proteína desplegada en mamíferos (UPR, *unfolded protein response*).** El ER contiene proteínas transmembrana que funcionan como sensores de eventos de estrés que ocurren dentro de la luz del ER. En condiciones normales, estos sensores están presentes en un estado inactivo como resultado de su asociación con chaperonas, particularmente BiP (paso 1). Si el número de proteínas desplegadas o mal plegadas debe aumentar a un nivel alto, las chaperonas se reclutan para ayudar en el plegamiento de proteínas, lo que deja a los sensores en su estado desactivado, activado y capaz de iniciar un UPR. Se han identificado al menos tres rutas distintas de UPR en las células de mamíferos, cada una activada por un sensor de proteínas diferente. Dos de estas vías se representan en esta ilustración. En una de estas vías, la liberación de la proteína inhibidora BiP conduce a la dimerización de un sensor (llamado PERK) (paso 2). En su estado dimérico, PERK se convierte en una proteína cinasa activada que fosforila una proteína (eIF2α) que se requiere para el inicio de la síntesis de proteínas (paso 3). Este factor de traducción está inactivo en el estado fosforilado, lo que impide que la célula sintetice proteínas adicionales en el ER (paso 4), lo que le da a la célula más tiempo para procesar las proteínas que ya están presentes en la luz del ER. En la segunda vía descrita aquí, la liberación de la proteína BiP inhibidora permite que el sensor (llamado ATF6) se mueva al complejo de Golgi donde el dominio citosólico de la proteína se escinde fuera de su dominio transmembrana (paso 2a). La porción citosólica del sensor se difunde a través del citosol (paso 3a) y hacia el núcleo (paso 4a), donde estimula la expresión de genes cuyas proteínas codificadas pueden aliviar la tensión en el ER (paso 5a). Estos incluyen chaperonas, proteínas de la capa que se forman en las vesículas de transporte y proteínas de la maquinaria de control de calidad. (La discusión del tercer sensor de proteína (IRE1) se puede encontrar en *Science* 2011;334:1081.)

## 8.7 Mecanismos que aseguran la destrucción de proteínas mal plegadas

Acabamos de ver cómo las enzimas del ER detectan las proteínas que no se pueden plegar correctamente. Fue una sorpresa descubrir que las proteínas mal plegadas no se destruyen en el ER, sino que se transportan al citosol por un proceso de *dislocación*. El mecanismo preciso de la dislocación sigue siendo un tema de debate. Una vez en el citosol, las cadenas de oligosacáridos se eliminan, y las proteínas mal plegadas se destruyen en los proteasomas, que son máquinas que degradan proteínas cuya estructura y función se analizan en la sección 12.7. Este proceso, conocido como *degradación asociada a ER* (ERAD, *ER-associated degradation*), asegura que las proteínas aberrantes no se transporten a otras partes de la célula, pero puede tener consecuencias negativas. Más de 60 enfermedades humanas, incluida la fibrosis quística, se atribuyen a la vía ERAD. En la mayoría de los pacientes con fibrosis quística, la membrana plasmática de las células epiteliales carece de proteína anormal codificada por el gen de la fibrosis quística (sección 4.15). En estos casos, la proteína mutante (que a menudo sería funcional si se deja tiempo suficiente para su plegamiento) es destruida por el proceso de control de calidad del ER y por tanto no llega a la superficie de la célula.

Bajo ciertas circunstancias, las proteínas mal plegadas se pueden generar en el ER a un ritmo más rápido de lo que se pueden exportar al citoplasma. La acumulación de proteínas mal plegadas, que es potencialmente letal para las células, desencadena un "plan de acción" integral dentro de la célula conocida como **respuesta de proteína desplegada** (**UPR**, unfolded *protein response*). El ER contiene sensores de proteínas que monitorean la concentración de proteínas desplegadas o mal plegadas en la luz del ER. De acuerdo con el modelo predominante descrito en la **FIGURA 8-18**, los sensores normalmente se mantienen en un estado inactivo por chaperonas moleculares, particularmente BiP. Si las circunstancias conducen a una acumulación de proteínas mal plegadas, las moléculas de BiP en la luz del ER se ponen en servicio como chaperonas para las proteínas mal plegadas, lo que las hace incapaces de inhibir los sensores. La activación de los sensores conduce a una multitud de señales que se transmiten tanto al núcleo como al citosol y dan como resultado:

- La expresión de cientos de genes diferentes cuyas proteínas codificadas tienen el potencial de aliviar las condiciones de estrés en el ER. Estos incluyen genes que codifican 1) chaperonas moleculares basadas en el ER que pueden ayudar a las proteínas mal plegadas a alcanzar el estado nativo, 2) proteínas involucradas en el transporte de las proteínas fuera del ER y 3) proteínas involucradas en la destrucción selectiva de proteínas anormales como se discutió antes.
- Fosforilación de una proteína clave (eIFα) requerida para la síntesis de proteínas. Esta modificación inhibe la síntesis de proteínas y disminuye el flujo de proteínas recién sintetizadas en el ER. Esto le da a la célula la oportunidad de eliminar las proteínas que ya están presentes en la luz del ER.

Curiosamente, el UPR es más que un mecanismo de supervivencia celular; también incluye la activación de una vía que conduce a la muerte de la célula. Se presume que el UPR proporciona un mecanismo para aliviar las condiciones estresantes. Si estas medidas correctivas no son exitosas, la vía de muerte celular se desencadena y la célula se destruye.

### REPASO

1. Describa los mecanismos mediante los cuales la célula garantiza que las proteínas mal plegadas *a*) no pasarán desapercibidas en el ER y *b*) no se acumularán a niveles excesivos dentro de la luz del ER.

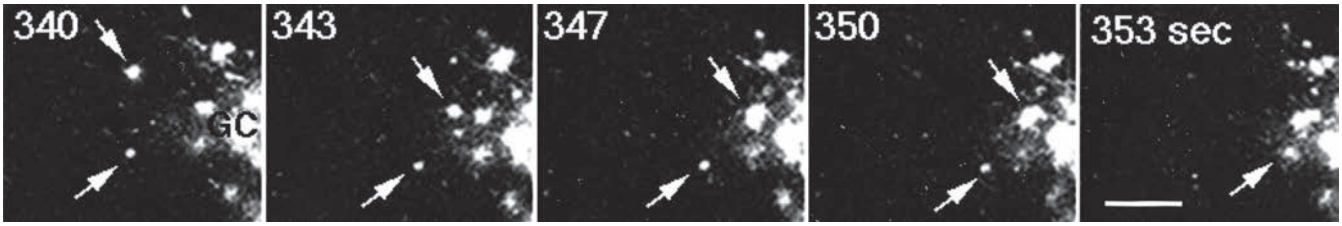



**FIGURA 8-19 Visualización del tráfico de la membrana con el uso de una etiqueta fluorescente.** Esta serie de fotografías muestra una pequeña porción de una célula viva de mamífero que ha sido infectada con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) que contiene un gen quimérico *VSVG-GFP* (figura 8-4). Una vez que se sintetiza en el RER, la proteína de fusión emite una fluorescencia verde, que se puede seguir a medida que la proteína se mueve a través de la célula. En la serie de fotografías que se muestran aquí, dos portadores tubulares vesiculares (VTC, *vesicular-tubular carriers*) (flechas) que contienen la proteína fluorescente han brotado del ER y se están moviendo hacia el complejo de Golgi (GC, *Golgi complex*). La serie de eventos representados aquí tuvo lugar durante un periodo de 13 segundos. La barra representa 6 µm.

FUENTE: de John F. Presley, *et al*. *Nature* 1997;389:82; © 1997, reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

## 8.8 Transporte vesicular del ER al Golgi

Las vesículas de membrana, con su carga cerrada, brotan desde los bordes del ER y están dirigidas al complejo de Golgi. Las cisternas del RER contienen sitios de salida especializados que están desprovistos de ribosomas y sirven como lugares donde se forman las primeras vesículas de transporte en la ruta biosintética. El viaje desde el ER hacia el complejo de Golgi se puede seguir visualmente en las células vivas marcando las proteínas secretoras con la proteína verde fluorescente (GFP) como se describe en la página 260. Usando esta técnica, se encuentra que poco después brotan de la membrana del ER, las vesículas de transporte se fusionan entre sí para formar vesículas más grandes y túbulos interconectados en la región entre el ER y el complejo de Golgi. Esta región ha sido llamada *retículo endoplásmico del compartimiento intermedio de Golgi* (ERGIC, *endoplasmic reticulum Golgi intermediate comparment*) y los portadores tubulares vesiculares que se forman allí se llaman *VTC* (véase figura 8-25*a*). Una vez formados, los VTC se alejan del ER hacia el complejo de Golgi. El movimiento de dos de estos portadores membranosos tubulares vesiculares del ERGIC al complejo de Golgi se muestra en la **FIGURA 8-19**. El movimiento de los VTC se produce a lo largo de pistas compuestas de microtúbulos.

### REPASO

1. Describa la región ERGIC y cómo se puede visualizar experimentalmente.

## 8.9 El complejo de Golgi

En los últimos años del siglo XIX, un biólogo italiano, Camillo Golgi, estaba inventando nuevos tipos de procedimientos de tinción que podrían revelar la organización de las células nerviosas dentro del sistema nervioso central. En 1898, Golgi aplicó una tinción metálica a las células nerviosas del cerebelo y descubrió una red reticular teñida de color oscuro ubicada cerca del núcleo de la célula. Esta red, que luego se identificó en otros tipos de células y se denominó **complejo de Golgi**, ayudó a su descubridor a obtener el Premio Nobel en 1906. El complejo de Golgi siguió siendo un centro de controversia durante décadas entre quienes creían que el organelo existía en las células vivas y aquellos quienes creían que era un *artefacto*, es decir, una estructura artificial formada durante la preparación para el microscopio. No fue sino hasta que el complejo de Golgi se identificó claramente en las células no fijadas y fracturadas por congelación (véase figura 18-20) que su existencia fue verificada más allá de toda duda razonable.

El complejo de Golgi tiene una morfología característica que consiste principalmente en cisternas aplanadas, en forma de disco, membranosas con bordes dilatados y vesículas y túbulos asociados (**FIGURA 8-20*a***). Las cisternas, cuyos diámetros son de 0.5 a 1.0 µm, están dispuestas en una pila ordenada, muy parecida a una pila de panqueques, y están curvadas de modo que se ve un cuenco poco profundo (figura 8-20*b*).[4] Una pila de Golgi contiene menos de ocho cisternas. Una célula individual puede contener de unas pocas a varias miles de pilas distintas, según el tipo de célula. Las pilas de Golgi en células de mamíferos forman un único complejo grande (figura 8-20*c*) situado de modo adyacente al núcleo de la célula (figura 8-20*d*). Una mirada más cercana a una cisterna individual sugiere que las vesículas brotan de un dominio tubular periférico de cada cisterna (figura 8-20*e*). Como se verá más adelante, muchas de estas vesículas contienen una capa de proteína distinta que se ve en la figura 8-20*e*).

El complejo de Golgi se divide en varios departamentos funcionalmente distintos dispuestos a lo largo de un eje desde la cara de entrada o *cis* más cercana al ER a la cara de salida o *trans* en el extremo opuesto de la pila (figuras 8-20 *a*, *b*). La cara más *cis* del organelo se compone de una red interconectada de túbulos denominada **red *cis* Golgi** (**CGN**, *cis Golgi network*). Se cree que la CGN funciona por lo general como una estación de clasificación que distingue entre las proteínas que se enviarán de regreso al ER (p. 284) y las que pueden continuar hasta la próxima estación de Golgi. La mayor parte del complejo de Golgi consiste en una serie de grandes cisternas aplanadas, que se dividen en **cisterna cis, *medial*** y ***trans*** (figura 8-20*a*). La cara más *trans* del organelo contiene una red distinta de túbulos y vesículas llamadas la **red *trans* Golgi** (**TGN**, *trans Golgi cisternae*). La TGN es una estación de clasificación donde las proteínas se segregan en diferentes tipos de vesículas que conducen a la membrana plasmática o a diversos destinos intracelulares. Se cree que los elementos membranosos del complejo de Golgi están soportados mecánicamente por un esqueleto de membrana periférica o un andamio compuesto por una variedad de proteínas, que incluyen miembros de la espectrina, anquirina y familias de actina, proteínas que también están presentes como parte del esqueleto de la membrana plasmática (p. 137). El andamio de Golgi se puede unir físicamente con proteínas motoras que dirigen el movimiento de vesículas y túbulos que entran y salen del complejo de Golgi. Se cree que un grupo separado de proteínas fibrosas forma una "matriz" de Golgi, que desempeña un papel clave en el desensamblaje y el reensamblaje del complejo de Golgi durante la mitosis.

La **FIGURA 8-21** proporciona evidencia visual de que el complejo de Golgi no es uniforme en su composición de un extremo a otro. Las diferencias en la composición de los compartimientos de membrana desde la cara *cis* a la *trans* reflejan el hecho de que el complejo de Golgi es por lo general una "planta de procesamiento". Las proteínas de membrana recién sintetizadas, así como las proteínas secretoras y lisosomales, abandonan el ER y

[4] Una sola pila de Golgi en las células de las plantas a veces se denomina dicitosoma.

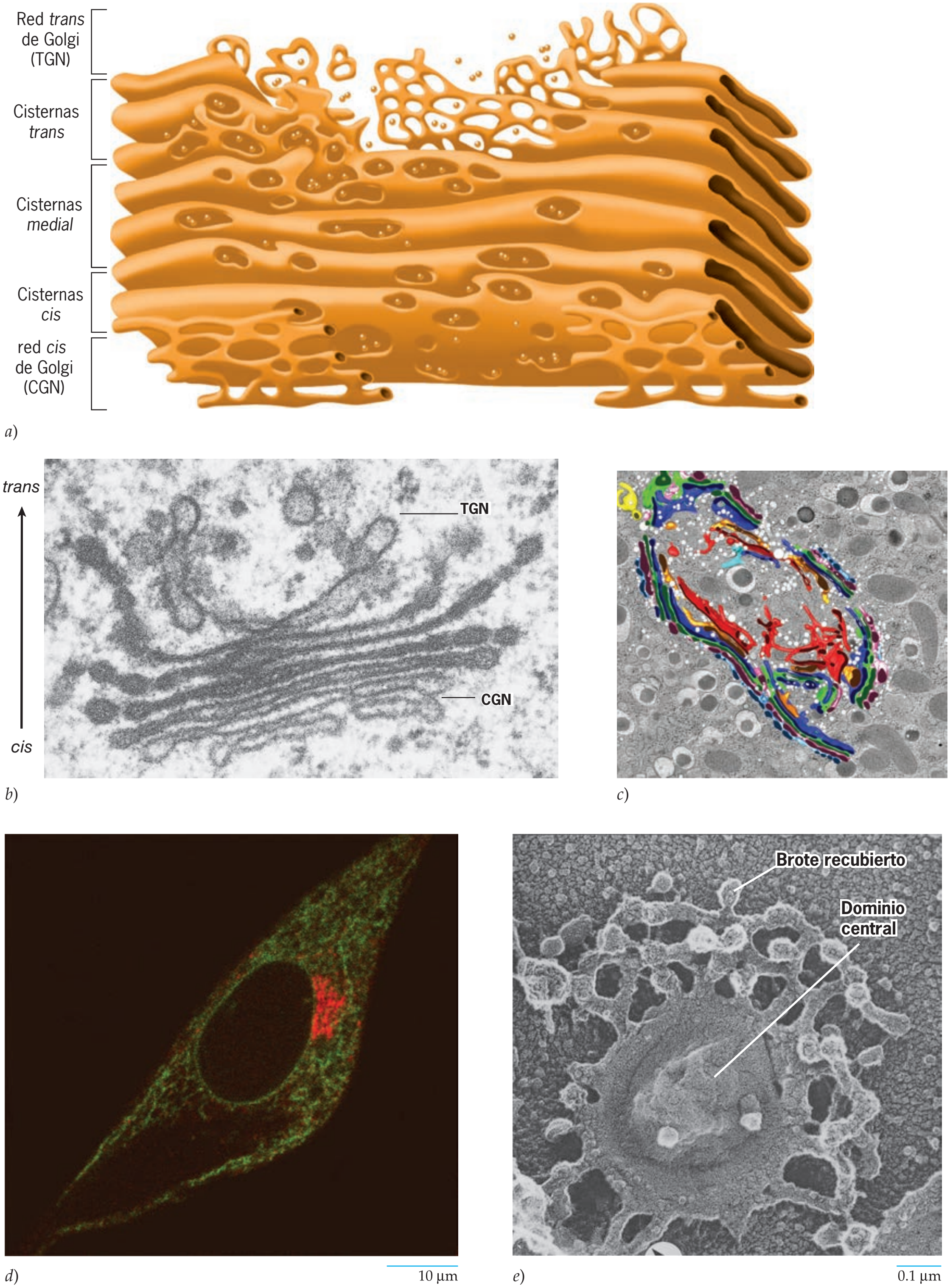



**FIGURA 8-20 El complejo de Golgi.** *a*) Modelo esquemático de una porción de un complejo de Golgi a partir de una célula epitelial del tracto reproductor de rata macho. Los elementos de los compartimientos *cis* y *trans* a menudo son discontinuos y aparecen como redes tubulares.
*b*) Micrografía electrónica de una porción de una capa de la célula de la raíz del tabaco que muestra la polaridad *cis* a *trans* de la pila de Golgi.
*c*) Imagen tomográfica electrónica de un corte de una célula beta pancreática de ratón que sintetiza y secreta la proteína insulina. Se ve que las pilas individuales de Golgi están interconectadas para formar una cinta continua. La cara *trans* (o TGN) de cada pila de Golgi se ha coloreado de rojo y la cara *cis* se ha coloreado de azul claro. *d*) Micrografía de fluorescencia de una célula de mamífero cultivada. La posición del complejo de Golgi se revela por la fluorescencia roja, que marca la localización de anticuerpos a una proteína de capa de COPI. *e*) Micrografía electrónica de una única cisterna de Golgi aislada que muestra dos dominios distintos, un dominio central cóncavo y un dominio periférico irregular. El dominio periférico consiste en una red tubular a partir de la cual los brotes recubiertos de proteína se pellizcan.

FUENTE: *a*) Tomada de A. Rambourg y Y. Clermont. Copyright 1990, *Eur J Cell Biol*. Originalmente publicada en *The Journal of Cell Biology* 1990;51:195; *b*) Cortesía de Thomas H. Giddings y Andrew Staehelin; *c*) reproducida por cortesía de Brad Marsh, Instituto de Biociencia Molecular, Universidad de Queensland, Australia. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Imagen publicada originalmente en *J Cell Biol* 2009;187:449; *d*) de Andrei V. Nikonov, *et al*. *J Cell Biol* 2002;158:500; cortesía de Gert Kreibich, reproducida con permiso de The Rockefeller University Press. *e*) De Peggy J. Weidman y John Heuser. *Trends Cell Biol* 1995;5:303; © 1995, con permiso de Elsevier Science.

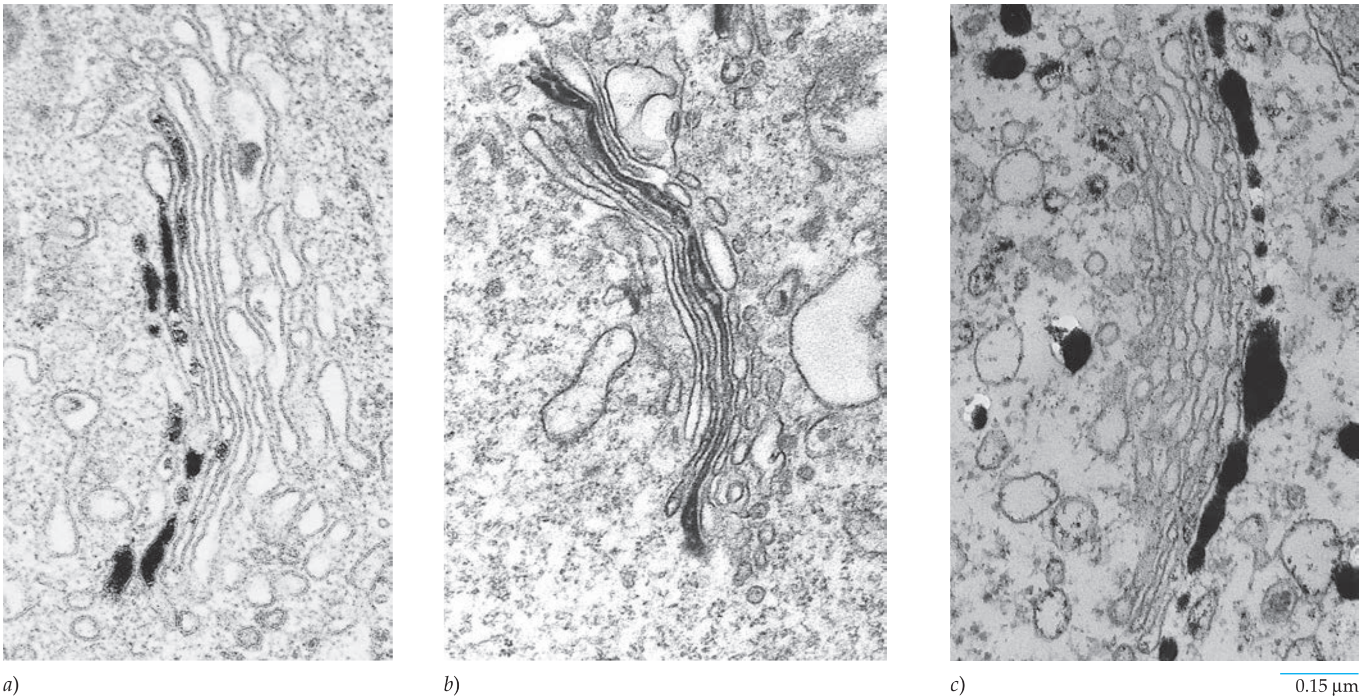



**FIGURA 8-21 Diferencias regionales en la composición de la membrana en la pila de Golgi.** *a*) El tetróxido de osmio reducido impregna preferencialmente las cisternas *cis* del complejo de Golgi. *b*) La enzima manosidasa II, que está implicada en el recorte de los residuos de manosa del oligosacárido central como se describe en el texto, se localiza por lo general en las cisternas *mediales*. *c*) La enzima nucleósido difosfatasa, que divide los dinucleótidos (p. ej., UDP) después de que han donado su azúcar, se localiza preferentemente en las cisternas *trans*.

FUENTE: *a*) Tomadas de Robert S. Decker. *J Cell Biol* 1974;61:603; *b*) de Angel Velasco, *et al*. *J Cell Biol* 1993;122:41. Todas reproducidas con permiso de The Rockefeller University Press. *c*) De Robert S. Decker. *J Cell Biol* 1974;61:603.

entran en el complejo de Golgi a su cara *cis* y luego pasan a través de la pila a la cara *trans*. A medida que avanzan a lo largo de la pila, las proteínas que se sintetizaron originalmente en el ER rugoso se modifican secuencialmente de maneras específicas. En la actividad de Golgi mejor estudiada, los carbohidratos de una proteína se modifican mediante una serie de reacciones enzimáticas paso a paso, como se analiza en la siguiente sección.

## Glucosilación en el complejo de Golgi

El complejo de Golgi desempeña un papel clave en el ensamblaje del componente carbohidrato de las glucoproteínas y glucolípidos. Cuando dejamos el tema de la síntesis de las cadenas de carbohidrato enlazadas a *N* en la página 274, los residuos de glucosa acababan de eliminarse de los extremos del oligosacárido del núcleo. A medida que las glucoproteínas solubles y de membrana recién sintetizadas pasan a través de las cisternas *medial* y *cis* de la pila de Golgi, la mayoría de los restos de manosa también se eliminan de los oligosacáridos del núcleo, y se añaden otros azúcares secuencialmente por diversas glucosiltransferasas.

En el complejo de Golgi, como en el RER, la secuencia en la que los azúcares se incorporan a los oligosacáridos está determinada por la disposición espacial de las glucosiltransferasas específicas que entran en contacto con la proteína recién sintetizada a medida que se mueve a través de la pila de Golgi. La enzima sialiltransferasa, por ejemplo, que coloca un ácido siálico en la posición terminal de la cadena en células animales, se localiza en la cara *trans* de la pila de Golgi, como se esperaría si las glucoproteínas recién sintetizadas se movieran de forma continua hacia esta parte del organelo. En contraste con los eventos de glucosilación que ocurren en el ER, que ensamblan un oligosacárido de núcleo único, las etapas de glucosilación en el complejo de Golgi pueden ser bastante variadas, produciendo dominios de carbohidratos de notable diversidad de secuencias. Una de las muchas rutas posibles de la glucosilación se muestra en la **FIGURA 8-22**. A diferencia de los oligosacáridos ligados a *N*, cuya síntesis comienza en el ER, aquellos unidos a las proteínas por los enlaces *O* (figura 4-11) se ensamblan completamente dentro del complejo de Golgi.

El complejo de Golgi es también el sitio de síntesis de la mayoría de los polisacáridos complejos de una célula, incluidas las cadenas de glucosaminoglucanos del proteoglucano que se muestran en la figura 7-9*a*) y las pectinas y hemicelulosas que se encuentran en las paredes celulares de las plantas (véase figura 7-34*c*).

## El movimiento de materiales a través del complejo de Golgi

Que los materiales se muevan a través de los diversos compartimientos del complejo de Golgi hace tiempo que ha sido establecido; sin embargo, dos puntos de vista contrastantes sobre la forma en que esto ocurre han dominado el campo durante años. Hasta mediados de la década de 1980, generalmente se aceptaba que las cisternas de Golgi eran estructuras transitorias. Se suponía que las cisternas de Golgi se formaron en la cara *cis* de la pila mediante la fusión de portadores membranosos del ER y ERGIC y que cada cisterna se movía físicamente desde la *cis* al extremo *trans* de la pila, cambiando en composición a medida que progresaba. Esto se conoce como el *modelo de maduración cisternal* porque, según el modelo, cada cisterna "madura" en la próxima cisterna a lo largo de la pila.

Desde mediados de la década de 1980 hasta mediados de la década de 1990, el modelo de maduración del movimiento de Golgi fue en gran medida abandonado y reemplazado por un modelo alternativo, que propuso que las cisternas de una pila de Golgi permanecen en su lugar como compartimientos estables. En este último modelo, que se conoce como *modelo de transporte vesicular*, la carga (es decir, proteínas secretoras, lisosomales y de membrana) se transporta a través de la pila de Golgi, desde la CGN al TGN, en vesículas que brotan de un compartimiento de membrana y se fusionan con un compartimiento vecino más adelante a lo largo de la pila. El modelo de transporte vesicular se

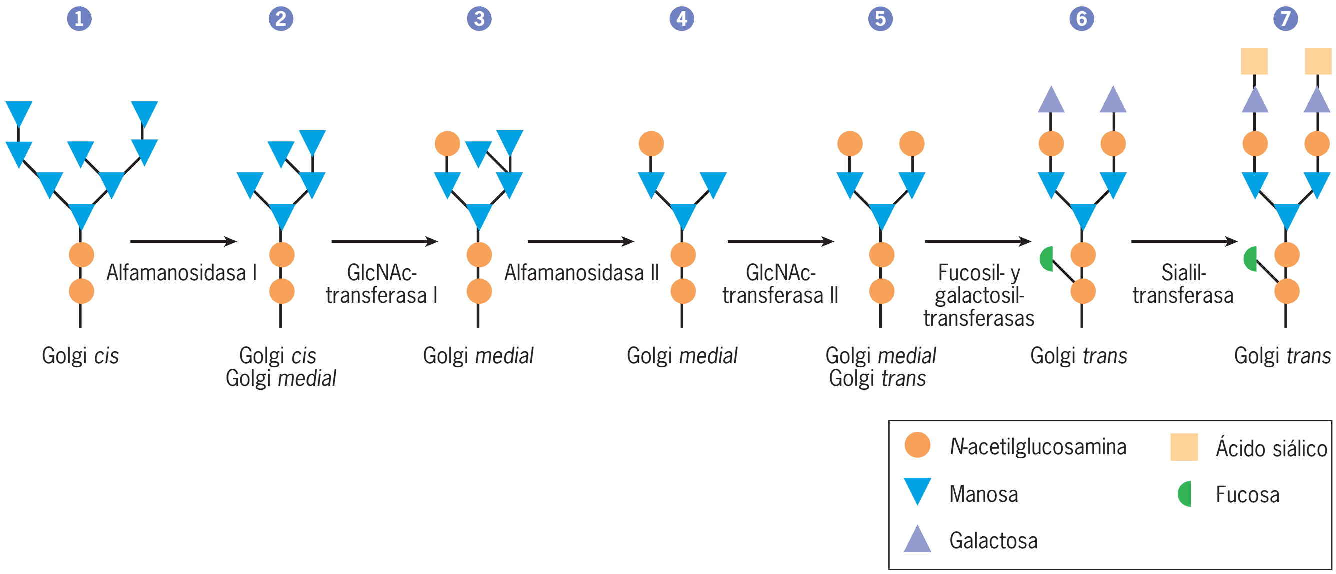



**FIGURA 8-22 Pasos en la glucosilación de un oligosacárido unido a *N* típico de mamífero en el complejo de Golgi.** Después de la eliminación de los tres residuos de glucosa, se eliminan luego varios restos de manosa, mientras que una variedad de azúcares (*N*-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico) se añaden al oligosacárido mediante glucosiltransferasas específicas. Estas enzimas son proteínas de membrana integrales cuyos sitios activos se enfrentan a la luz de las cisternas de Golgi. Esta es solo una de las numerosas rutas de glucosilación.

ilustra en la **FIGURA 8-23*a*)**, y su aceptación se basó en gran medida en las siguientes observaciones:

1. Cada una de las diversas cisternas de Golgi de una pila tiene una población distinta de enzimas residentes (figura 8-21). ¿Cómo podrían las diversas cisternas tener propiedades tan diferentes si cada cisterna estuviera dando lugar a la siguiente en línea, como lo sugiere el modelo de maduración cisternal?
2. Se pueden ver grandes cantidades de vesículas en micrografías electrónicas para brotar de los bordes de las cisternas de Golgi. En 1983, James Rothman y sus colegas de la Universidad de Stanford demostraron, usando preparaciones libres de células de membranas de Golgi (p. 263), que las vesículas de transporte podían brotar de una sola cisterna de Golgi y fusionarse con otra cisterna de Golgi *in vitro*. Este experimento característico formó la base de una hipótesis que sugiere que dentro de la célula, las vesículas portadoras de la carga brotaron de cisternas *cis* y se fusionaron con cisternas situadas en una posición más *trans* en la pila.

Aunque ambos modelos de la función de Golgi continúan teniendo sus defensores, el consenso de opinión ha cambiado al modelo de maduración cisternal. Varias de las principales razones de este cambio se pueden observar:

- El modelo de maduración cisternal prevé un complejo de Golgi muy dinámico en el que los elementos principales del organelo, las cisternas, se forman continuamente en la cara *cis* y se dispersan en la cara *trans*. Según este punto de vista, la propia existencia del complejo de Golgi depende de la afluencia continua de transportistas desde el ER y ERGIC. Según lo predicho por el modelo de maduración cisternal, cuando la formación de portadores de transporte del ER se bloquea ya sea por tratamiento de las células con fármacos específicos o por el uso de mutantes sensibles a la temperatura (figura 8-4), el complejo de Golgi simplemente desaparece. Cuando se eliminan los fármacos o las células mutantes vuelven a la temperatura permisiva, el complejo de Golgi se vuelve a ensamblar rápidamente a medida que se renueva el transporte del ER a Golgi.
- Se puede demostrar que ciertos materiales que se producen en el retículo endoplásmico y viajan a través del complejo de Golgi permanecen dentro de las cisternas de Golgi y nunca aparecen dentro de las vesículas de transporte asociadas a Golgi. Por ejemplo, los estudios sobre fibroblastos indican que grandes complejos de moléculas de procolágeno (los precursores del colágeno extracelular) (ilustrados por los objetos rojos en la figura 8-23*b*) se mueven desde cisternas *cis* a las cisternas *trans* sin salir de la luz cisternal.
- Se asumió hasta mediados de la década de 1990 que las vesículas de transporte siempre se movían en una dirección "hacia adelante" (*anterógrada*), es decir, de un origen *cis* a un destino más *trans*. Pero un gran cuerpo de evidencia ha indicado que las vesículas pueden moverse en una dirección "hacia atrás" (*retrógrada*), es decir, desde una membrana donadora *trans* a una membrana aceptora *cis*.
- Los estudios sobre gemación de células de levadura en vivo que contienen proteínas de Golgi marcadas fluorescentemente han demostrado de forma directa que la composición de una cisterna de Golgi individual puede cambiar con el tiempo, desde una que contiene proteínas residentes tempranas (*cis*) de Golgi hasta una que contiene proteínas residente tardías (*trans*) de Golgi. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 18-10, y no son compatibles con el modelo de transporte vesicular. Queda por determinar si estos resultados en la levadura se pueden extrapolar a un complejo de Golgi de mamífero, que tiene una estructura apilada más compleja.

Una versión actual del modelo de maduración cisternal se representa en la figura 8-23*b*). A diferencia de las versiones originales del modelo de maduración cisternal, la versión que se muestra en la figura 8-23*b*) reconoce el papel de las vesículas de transporte, que se ha demostrado claramente que brotan de las membranas de Golgi. En este modelo, sin embargo, estas vesículas de transporte no transportan la carga en una dirección anterógrada, sino que transportan las enzimas de Golgi residentes en una dirección retrógrada. En cambio, son las propias cisternas de Golgi las que sirven como portadoras de Golgi anterógradas primarias. Este modelo de transporte intraGolgi está respaldado por micrografías electrónicas del tipo ilustrado en la figura 8-23 *c*,*d*). Estas micrografías representan secciones ultrafinas de células de mamíferos cultivadas que se cortaron de un bloque congelado. En ambos casos, las secciones congeladas se trataron con anticuerpos que se unieron a partículas de oro antes del examen en el micros-

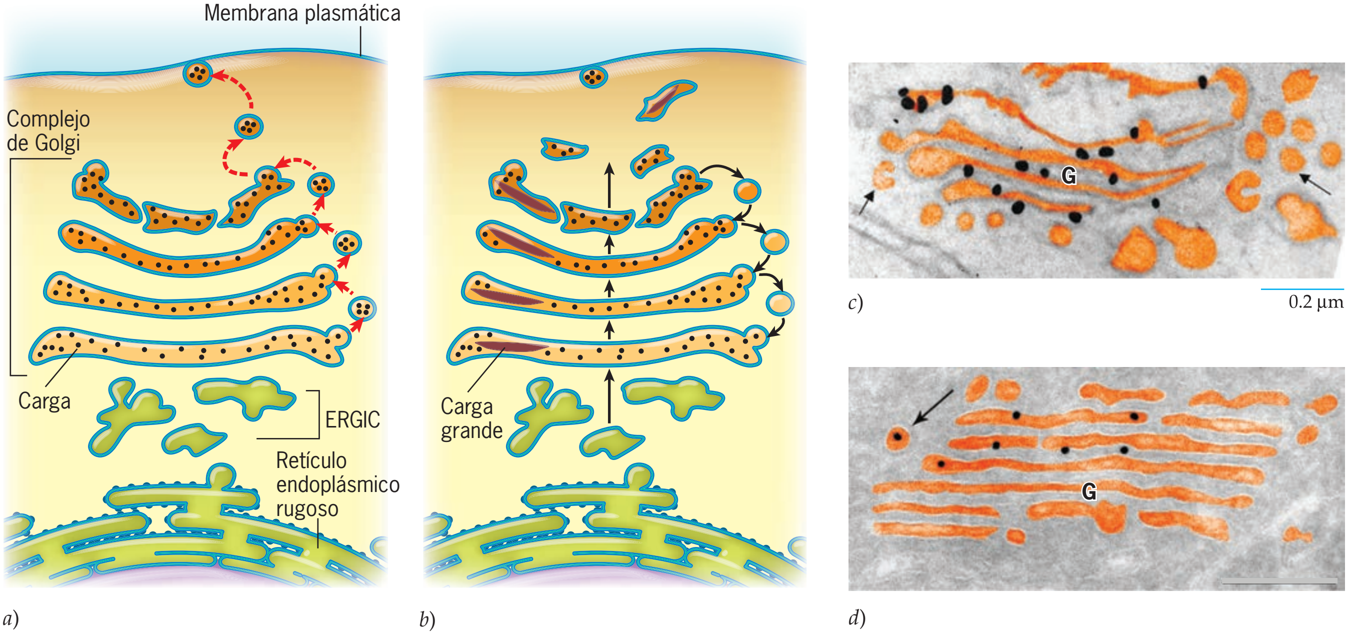



**FIGURA 8-23 La dinámica del transporte a través del complejo de Golgi.** *a*) En el modelo de transporte vesicular, la carga (puntos negros) se transporta en una dirección anterógrada mediante vesículas de transporte, mientras que las cisternas permanecen como elementos estables. *b*) En el modelo de maduración cisternal, las cisternas progresan gradualmente desde una posición *cis* a una *trans* y luego se dispersan en la TGN. Las vesículas de transporte portan las enzimas de Golgi residentes (indicadas por las vesículas de color) en una dirección retrógrada. Los objetos con forma de lente rojo representan grandes materiales de carga, como complejos de procolágeno de fibroblastos. *c*) Micrografía electrónica de un área del complejo de Golgi en una sección congelada delgada de una célula que había sido infectada con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Los puntos negros son de oro de tamaño nanométrico, partículas unidas por medio de anticuerpos a la proteína VSVG, una molécula de carga anterógrada. La carga está restringida a las cisternas y no aparece en las vesículas cercanas (flechas). *d*) Micrografía electrónica de naturaleza similar a la de *c*) pero, en este caso, las partículas de oro no están unidas a la carga, sino a la manosidasa II, una enzima residente de las cisternas de Golgi medial. La enzima aparece tanto en una vesícula (flecha) como en cisternas. La vesícula marcada tal vez lleva la enzima en una dirección retrógrada, que compensa el movimiento anterógrado de la enzima como resultado de la maduración cisternal. Bar, 0.2µm. (Un tercer modelo para el transporte intraGolgi se discute en *Cell* 133: 951, 2008).

FUENTE: *a*) Modelo de transporte vesicular; *b*) modelo de madurez cisternal. *c*) Tomada de Alexander A. Mironov, *et al*. Cortesía de Alberto Luini. *J Cell Biol* 2001;155:1234, reproducida con permiso de The Rockefeller University Press; *d*) tomada de José A. Martínez-Menarguez, *et al*. Cortesía de Judith Klumperman. *J Cell Biol* 2001;155:1214, reproducido con permiso de The Rockefeller University Press.

copio electrónico. La figura 8-23*c*) muestra una sección a través de un complejo de Golgi después del tratamiento con anticuerpos marcados con oro que se unen a una proteína de carga, en este caso la proteína viral VSVG (figura 8-4). Las moléculas de VSVG están presentes dentro de las cisternas, pero están ausentes de las vesículas cercanas (flechas), lo que indica que la carga se transporta en dirección anterógrada dentro de cisternas en proceso de maduración, pero no dentro de pequeñas vesículas de transporte. La figura 8-23*d*) muestra una sección a través de un complejo de Golgi después del tratamiento con anticuerpos marcados con oro que se unen a una proteína residente de Golgi, en este caso la enzima de procesamiento manosidasa II. A diferencia de la proteína de carga VSVG, las moléculas de manosidasa II se encuentran tanto en la cisterna como en las vesículas asociadas (flecha), lo que apoya firmemente la propuesta de que estas vesículas se utilicen para transportar las enzimas residentes de Golgi en una dirección retrógrada. Las proteínas residentes de Golgi también pueden moverse en dirección retrógrada a través de los túbulos que se han visto para conectar diferentes cisternas de Golgi.

El modelo de maduración cisternal representado en la figura 8-23*b*)explica cómo las diferentes cisternas de Golgi en una pila pueden tener una identidad única. Una enzima como la manosidasa II, por ejemplo, que elimina los residuos de manosa de los oligosacáridos y está restringida a las cisternas *medial* (figura 8-21), puede reciclarse hacia atrás en vesículas de transporte a medida que cada cisterna se mueve hacia el extremo *trans* de la pila. Cabe señalar que una serie de destacados investigadores continúan argumentando, sobre la base de otros resultados experimentales, que la carga puede transportarse mediante vesículas de transporte entre las cisternas de Golgi en una dirección anterógrada. Por tanto, el asunto queda por resolver.

**REPASO**

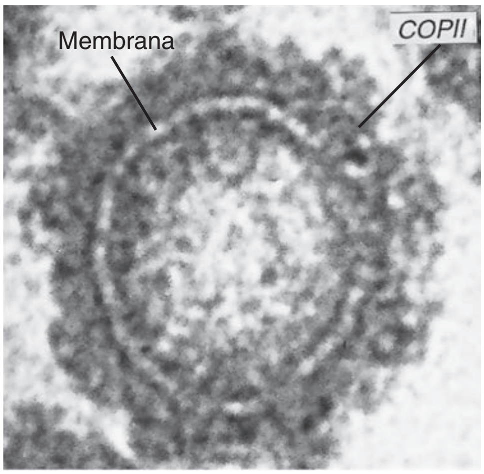
1. Describa los pasos que ocurren como una proteína secretora soluble, como una enzima digestiva en una célula del páncreas, que se mueve desde el RER a la cisterna *cis* de Golgi; de una cisterna ***cis*** a la TGN.
2. ¿Cuál es el papel del dolicol fosfato en la síntesis de glucoproteínas de membrana? ¿Cómo se determina la secuencia de azúcares unidos a la proteína?
3. ¿Cómo se compara el proceso de glucosilación en el complejo de Golgi con el del RER?
4. ¿Cómo se puede conciliar el modelo de maduración cisternal de la actividad de Golgi con la presencia de vesículas de transporte en la región de Golgi?

## 8.10 Tipos de vesículas de transporte

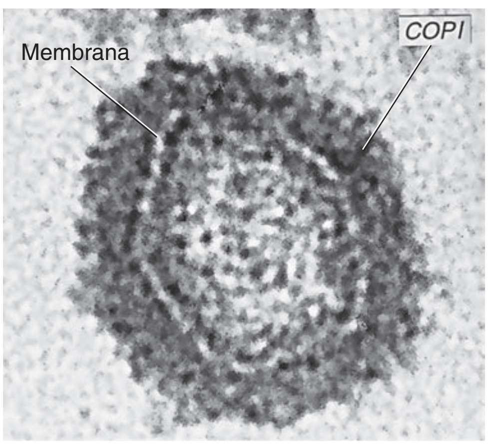
La ruta biosintética de una célula eucariota consiste en una serie de organelos distintos unidos a la membrana que funcionan en la síntesis, modificación y entrega de proteínas solubles y de membrana a su destino apropiado en la célula. Como se ilustra en la figura 8-2*a*, los materiales se transportan entre compartimientos mediante vesículas (u otros tipos de portadores unidos a la membrana) que brotan de las membranas donantes y se fusionan con membranas aceptoras. Si se examinan micrográficamente los gráficos de electrones para detectar vesículas atrapadas en el mo-

mento de la gemación, se encuentra que la mayoría de estos brotes membranosos están cubiertos en su superficie citosólica por una capa densa "difusa" de electrones. Un análisis posterior revela que la capa de tinción oscura consiste en una capa proteica formada a partir de proteínas solubles que se ensamblan en la superficie citosólica de la membrana del donante en los sitios donde tiene lugar la gemación. Cada brote recubierto se desprende para formar una **vesícula recubierta** como las que se muestran en la **FIGURA 8-24**. Las vesículas de tamaño y estructura similares se pueden formar en sistemas libres de células como se ilustra en la figura 8-6. (El descubrimiento de vesículas recubiertas se discute en las "Vías experimentales" en la sección 8.18).

Las capas proteicas tienen al menos dos funciones distintas: 1) actúan como un dispositivo mecánico que hace que la membrana se curve y forme una vesícula en gemación, y 2) proporcionan un mecanismo para seleccionar los componentes que transportará la vesícula. Los componentes seleccionados incluyen *a*) carga que consiste en proteínas secretoras, lisosomales y de membrana para ser transportadas y *b*) la maquinaria requerida para dirigir y acoplar la vesícula a la membrana correctora aceptora (sección 8.13). En los casos mejor entendidos (véanse las figuras 8-26 y 8-40), el recubrimiento de vesículas está compuesto por dos capas proteicas distintas: una jaula o andamio externo que forma el armazón del revestimiento y una capa interna de adaptadores que se une a la superficie externa de la bicapa lipídica y la carga de la




*a*)




*b*)

**FIGURA 8-24 Vesículas recubiertas.** Las micrografías electrónicas muestran que las membranas de estas vesículas se cubren en su superficie externa (citosólica) mediante una capa proteica distinta. La micrografía en la parte superior a) muestra una vesícula recubierta con COPII, mientras que la micrografía en el fondo b) muestra una vesícula recubierta con COPI.
FUENTE: *a-b*) Cortesía de Randy Schekman y Lelio Orci.

membrana. Como se analiza a continuación, los adaptadores pueden seleccionar moléculas de carga específicas en virtud de su afinidad específica por las "colas" citosólicas de las proteínas integrales que residen en la membrana del donante (véase **FIGURA 8-25*b***).

Se han identificado varias clases distintas de vesículas recubiertas; se distinguen por las proteínas que componen su cubierta, su apariencia en el microscopio electrónico y su papel en el tráfico celular. Las tres vesículas recubiertas mejor estudiadas son las siguientes:

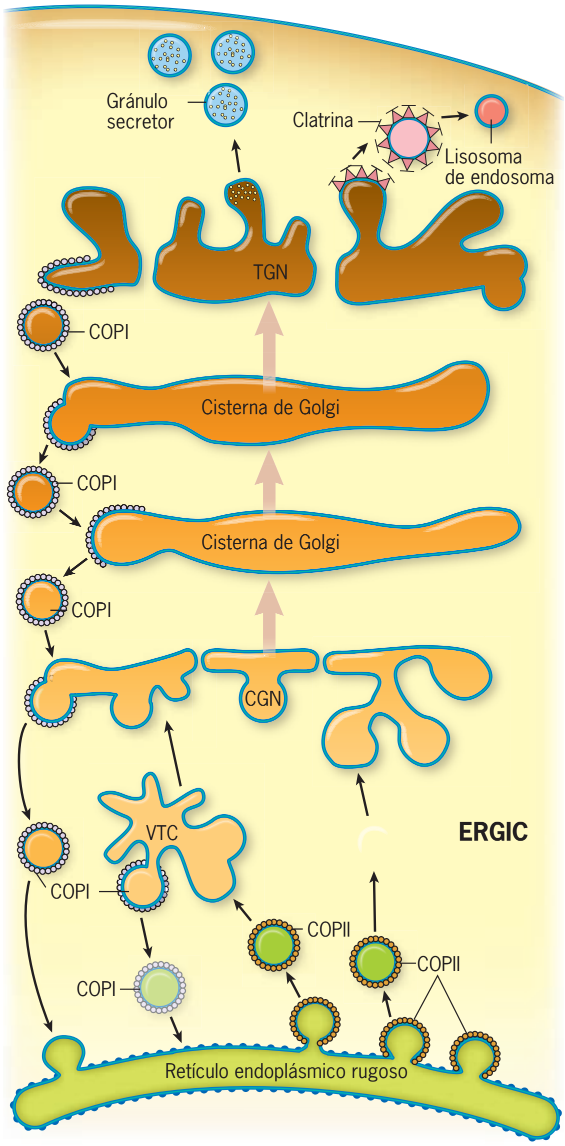
1. **Las vesículas recubiertas con COPII** (figura 8-24*a*) mueven los materiales del ER "hacia adelante" al complejo ERGIC y Golgi. (Recuerde de la sección 8.8 que el ERGIC es el compartimiento intermedio situado entre el ER y el complejo de Golgi). (COP es un acrónimo de proteínas de la cubierta).
2. **Las vesículas recubiertas de COPI** (figura 8-24*b*) mueven los materiales en dirección retrógrada 1) desde ERGIC y pilas de Golgi hacia "atrás" hacia el ER y 2) desde cisternas de Golgi *trans* hacia atrás a cisternas de Golgi *cis* (véase figura 8-25*a*). Papeles adicionales para vesículas COPI han sido debatidos.
3. **Las vesículas recubiertas** de clatrina mueven los materiales del TGN a los endosomas, lisosomas y vacuolas de las plantas. También mueven materiales de la membrana plasmática a compartimientos citoplásmicos a lo largo de la vía endocítica. También han sido implicados en el tráfico de endosomas y lisosomas.

Consideraremos cada tipo de vesícula recubierta en las siguientes secciones. En la figura 8-25*a*) se muestra un resumen de los diversos pasos de transporte a lo largo de la ruta biosintética o secretora mediada por cada una de estas vesículas recubiertas, y en la figura 8-27*b*) se muestra una comparación de sus estructuras.

## Vesículas recubiertas con COPII: transporte de carga desde el ER al complejo de Golgi

Las vesículas recubiertas con COPII median en la primera etapa del viaje a través de la vía biosintética, desde el ER hasta ERGIC y el complejo Golgi (figura 8-25). El recubrimiento de COPII contiene varias proteínas que se identificaron por primera vez en células de levadura mutantes que no pudieron llevar a cabo el transporte desde el ER al complejo de Golgi. Los homólogos de las proteínas de la levadura se encontraron después en las capas de vesículas que brotan del ER en las células de mamíferos. Los anticuerpos contra las proteínas recubiertas COPII bloquean la gemación de las vesículas de las membranas de ER, pero no tienen ningún efecto sobre el movimiento de la carga en otras etapas de la vía secretora.

Las capas COPII seleccionan y concentran ciertos componentes para el transporte en vesículas. Ciertas proteínas integrales de membrana del ER se capturan de forma selectiva porque contienen señales de "exportación de ER" como parte de su cola citosólica. Estas señales interactúan específicamente con las proteínas COPII del recubrimiento vesicular (**FIGURA 8-26**). Las proteínas seleccionadas por vesículas recubiertas con COPII incluyen 1) enzimas que actúan en etapas posteriores de la vía biosintética, como las glucosiltransferasas del complejo de Golgi (indicadas como proteínas de membrana naranja en la figura 8-26); 2) proteínas de membrana implicadas en el acoplamiento y la fusión de la vesícula con el compartimiento objetivo, y 3) proteínas de membrana que pueden unir carga soluble (como las proteínas secretoras, indicadas por las esferas rojas en la figura 8-26). Las células que carecen de un receptor de carga específico típicamente no transportan un subconjunto específico de proteínas desde el ER al complejo de Golgi. Por ejemplo, las mutaciones en un receptor de carga (ERGIC-53) se han relacionado con un trastorno hemorrágico hereditario. Las personas con este trastorno no



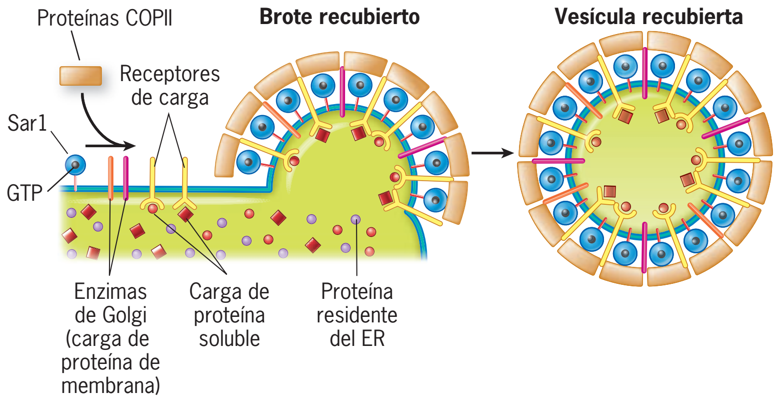




**FIGURA 8-25 Movimiento propuesto de materiales mediante transporte vesicular entre compartimientos membranosos de la vía biosintética/secretora.** *a*) Se cree que los tres tipos diferentes de vesículas recubiertas indicadas en este dibujo esquemático tienen roles de transporte distintos. Las vesículas recubiertas con COPII median el transporte desde el RE al ERGIC y al complejo de Golgi. Las vesículas recubiertas con COPI devuelven las proteínas del ERGIC y del complejo de Golgi al ER. Las vesículas recubiertas con COPI también transportan las enzimas de Golgi entre las cisternas en una dirección retrógrada. Las vesículas recubiertas de claritina median el transporte desde el TGN hasta los endosomas y los lisosomas. El transporte de materiales a lo largo de la vía endocítica no se muestra en este dibujo. *b*) Dibujo esquemático del ensamblaje de una vesícula recubierta con COPII en el ER. El ensamblaje comienza cuando se recluta Sar1 a la membrana del ER y se activa mediante el intercambio de su GDP unido con un GTP unido. Estos pasos se muestran en la figura 8-26. Las proteínas de carga de la luz del ER (esferas rojas y diamantes) se unen a los extremos de la luz de los receptores de carga transmembrana. Estos receptores se concentran dentro de la vesícula recubierta a través de la interacción de sus colas citosólicas con los componentes de la capa COPII. Las proteínas residentes del ER (p. ej., BiP) generalmente se excluyen de las vesículas recubiertas. Aquellos que pasan a estar incluidos en una vesícula recubierta se devuelven al ER como se describe más adelante en el texto.

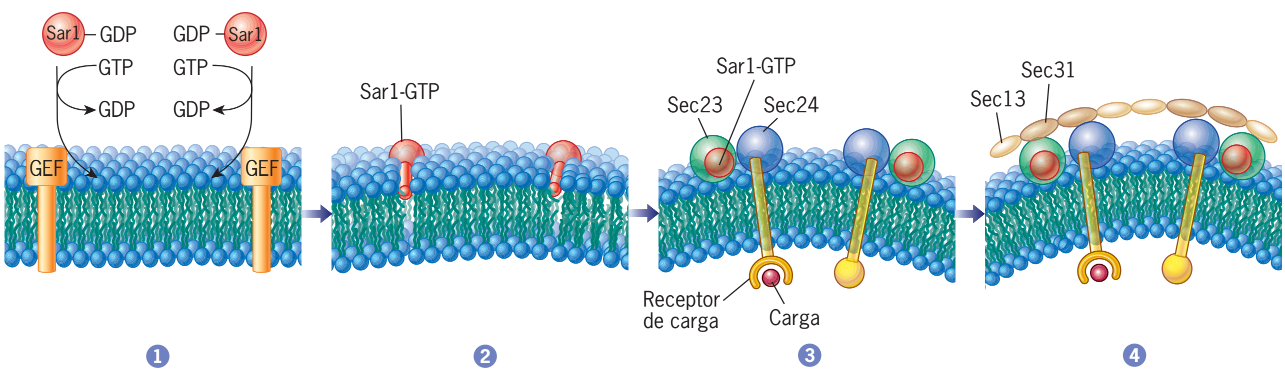



**FIGURA 8-26 Roles propuestos de las proteínas recubiertas COPII en la generación de la curvatura de la membrana, el ensamblaje de la cubierta proteica y la captura de la carga.** En el paso 1, las moléculas de Sar1-GDP se han reclutado en la membrana del ER mediante una proteína llamada factor de intercambio de guanina (GEF, *guanine-exchange factor*) que cataliza el intercambio del GDP unido con un GTP unido. En el paso 2, cada molécula de Sar1-GTP ha extendido una hélice similar a un dedo a lo largo de la membrana dentro de la valva citosólica. Este evento expande la valva e induce la curvatura de la bicapa lipídica en ese sitio. En la etapa 3, un dímero compuesto por dos polipéptidos COPII (Sec23 y Sec24) ha sido reclutado por el Sar1-GTP unido. Se cree que el heterodímero Sec23-Sec24 induce más la curvatura de la membrana en la formación de una vesícula. Tanto Sar1 como Sec23-Sec24 pueden provocar la curvatura de la membrana cuando se incuban con liposomas sintéticos *in vitro*. La carga transmembrana se acumula dentro de la vesícula COPII que se forma cuando sus colas citosólicas se unen al polipéptido Sec24 del revestimiento COPII. Sec24 puede existir en al menos cuatro isoformas diferentes. Es probable que las diferentes isoformas de esta proteína reconozcan y unan proteínas de membrana con diferentes señales de clasificación, ampliando así la especificidad en los tipos de materiales que pueden ser transportados por vesículas de COPII. En el paso 4, los polipéptidos restantes de COPII (Sec13 y Sec31) se han unido al complejo para formar un armazón estructural externo del revestimiento.

FUENTE: Reimpreso de Stephan Fath, *et al*. Cortesía de Jonathan Goldberg. *Cell* 2007;129:1333, con permiso de Elsevier.

pueden secretar ciertos factores de coagulación que promueven la coagulación de la sangre.

Entre las proteínas de la capa COPII se encuentra una pequeña proteína G llamada Sar1, que se recluta específicamente para la membrana del ER. Al igual que otras proteínas G, Sar1 desempeña un papel regulador, en este caso iniciando la formación de vesículas y regulando el ensamblaje del recubrimiento vesicular. Estas actividades se ilustran en la figura 8-26. En el paso 1 de la figura 8-26, se recluta Sar1 a la membrana del ER en la forma unida a GDP y se induce a intercambiar su GDP por una molécula de GTP. Tras la unión de GTP, Sar1 sufre un cambio conformacional que hace que su hélice *N*-terminal se inserte en la valva citosólica de la bicapa del ER (paso 2). Se ha demostrado que este evento dobla la bicapa lipídica, que es un paso importante en la conversión de una membrana aplanada en una vesícula esférica. La flexión de la membrana probablemente se vea favorecida por un cambio en el empaquetamiento de los lípidos que forman las dos valvas de la bicapa. En el paso 3, Sar1-GTP ha reclutado dos polipéptidos adicionales de la capa de COPII, Sec23 y Sec24, que se unen como un dímero de "forma de plátano". Debido a su forma curva (figura 8-27), el dímero Sec23-Sec24 proporciona presión adicional sobre la superficie de la membrana para ayudar a que se doble aún más en un brote curvo. Sec24 también funciona como la proteína adaptadora primaria de la capa de COPII que interactúa específicamente con las señales de exportación del ER en las colas citosólicas de las proteínas de membrana que están destinadas al tráfico en el complejo de Golgi. En la figura 8-26, paso 4, las subunidades restantes de la capa de COPII, Sec13 y Sec31, se unen a la membrana para formar la estructura externa de la cubierta proteica. La **FIGURA 8-27*a*)** muestra una representación de una vesícula de 40-nm con el revestimiento de COPII unido a su superficie. La jaula de Sec13-Sec31 se ensambla en una red relativamente simple en la que cada vértice está formado por la convergencia de cuatro patas Sec13-Sec31 (figura 8-27). Se incorpora un cierto grado de flexibilidad en la bisagra entre las subunidades Sec13-Sec31 que les permiten formar jaulas de diámetro variable, acomodando vesículas de diferentes tamaños.

Una vez que se ha ensamblado toda la capa de COPII, el brote se separa de la membrana del ER en forma de una vesícula recubierta con COPII. Antes de que la vesícula recubierta pueda

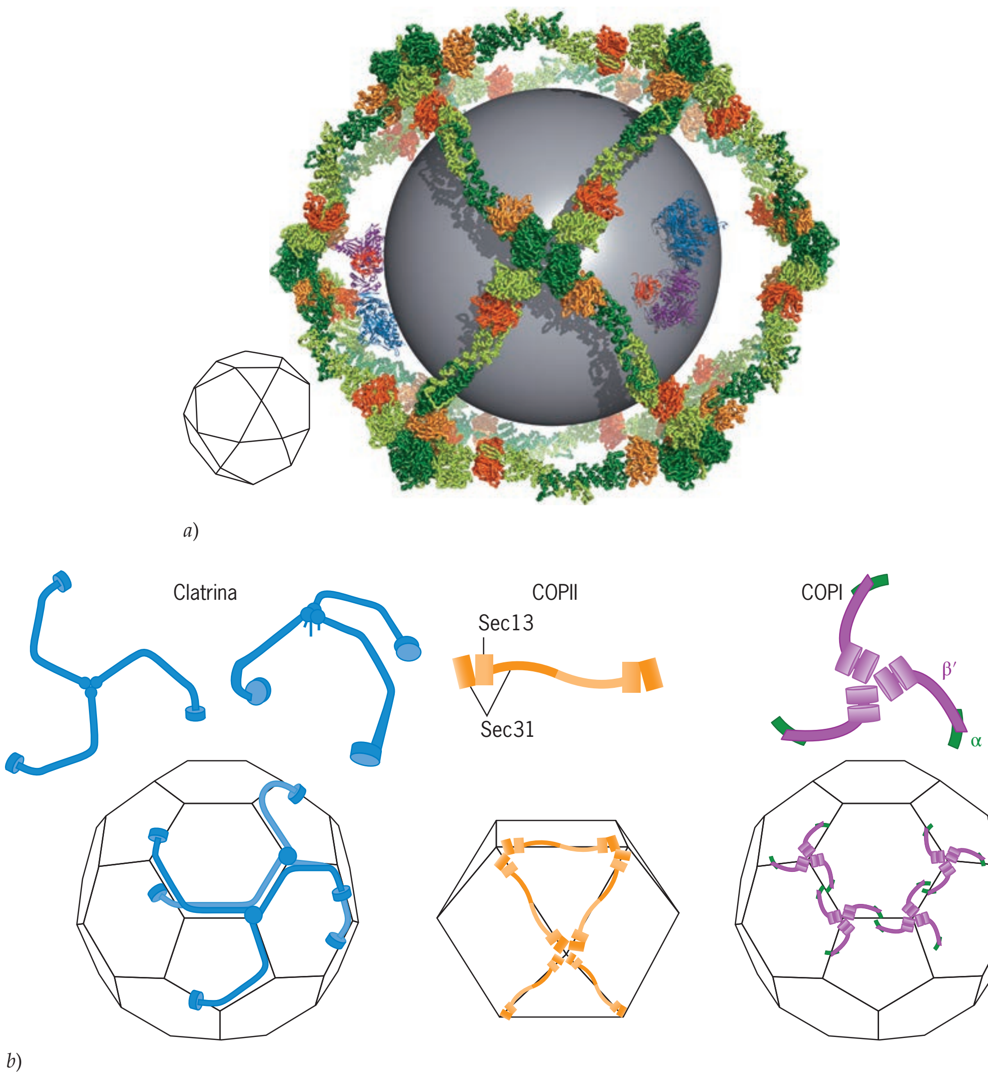



**FIGURA 8-27** Estructura de capas de vesículas. *a*) Modelo molecular de la jaula Sec13-Sec31 externa de la capa COPII, ya que se ensamblaría alrededor de la superficie de una "vesícula" de 40-nm. Cada borde o pata del enrejado que conforma la jaula consiste en un heterotetrámero (dos subunidades Sec31 vistas como verde oscuro y verde claro y dos subunidades Sec13 vistas como naranja y rojo). Cuatro de tales patas convergen para formar cada vértice del enrejado. En este modelo también se muestran dos copias del complejo Sar1-Sec23-Sec24 (que se muestra en rojo, magenta y azul, respectivamente) que formarían la capa interna de la capa COPII. Se puede ver cómo la superficie interna del complejo Sec23-Sec24 se ajusta a la curvatura de la vesícula. El recuadro muestra un enrejado COPII, que está compuesto por caras triangulares y cuadradas, pentagonales y/o hexagonales. *b*) Dibujo esquemático de las estructuras de las capas de clatrina, COPII y COPI.

FUENTE: *a*) Tomada de Stephan Fath, *et al*. Cortesía de Jonathan Goldberg. *Cell* 2007;129:1333, con permiso de Elsevier. b) De S. Harrison y T. Kirchhausen. *Nature* 2010;466:1048-1049, Reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

fusionarse con una membrana blanco, la capa de proteína debe ser desmontada y sus componentes liberados en el citosol. El desensamblaje se desencadena por la hidrólisis del GTP unido para producir una subunidad Sar1-GDP, que tiene una afinidad disminuida para la membrana de la vesícula. La disociación de Sar1-GDP de la membrana es seguida por la liberación de las otras subunidades COPII.

## Vesículas recubiertas COPI-: transporte de proteínas escapadas devueltas al ER

Las vesículas recubiertas con COPI se identificaron primero en experimentos en los que las células se trataron con moléculas de estructura similar a GTP (análogos de GTP) pero, a diferencia de GTP, no se pudieron hidrolizar. En estas condiciones, las vesículas recubiertas con COPI se acumulaban dentro de la célula y podían aislarse de las células homogeneizadas mediante centrifugación en gradiente de densidad (sección 18.6). Las vesículas recubiertas de COPI se acumulan en presencia de un análogo de GTP no hidrolizable porque, similar a sus contrapartes de COPII, el revestimiento contiene una proteína de unión a GTP de doble membrana, llamada Arf1, cuyo GTP unido debe hidrolizarse antes de que la capa pueda desensamblarse.

La capa de COPI se compone de un complejo de siete proteínas llamado *coatómero*. Los estudios estructurales han sugerido que, al igual que la clatrina (que se analiza con más detalle en la sección 8.17), la porción exterior de las redes COPI puede construirse a partir de subunidades de tres patas de triskelion (figura 8-27*b*). Sin embargo, todavía no se han obtenido estructuras de alta resolución del recubrimiento de COPI.

Las vesículas COPI-recubiertas han estado implicadas más claramente en el transporte retrógrado de proteínas, incluido el movimiento de 1) enzimas residentes de Golgi en una dirección *trans* a *cis* [como se indica en la figura 8-23*d*), que muestra una molécula de manosidasa II marcada con oro en una vesícula COPI] y 2) las enzimas del ER residentes del ERGIC y el complejo de Golgi regresan al ER (figura 8-25). Para comprender el papel de las vesículas COPI-recubiertas en el transporte retrógrado, tenemos que considerar la retención y recuperación de las proteínas del ER residentes.

Si las vesículas brotan de forma continua de los compartimientos de la membrana, ¿cómo conserva cada compartimiento su composición única? ¿Qué determina, por ejemplo, si una proteína particular en la membrana del ER permanece en el ER o continúa en el complejo de Golgi? Los estudios sugieren que las proteínas se mantienen en un organelo mediante una combinación de dos mecanismos:

1. *Retención* de moléculas residentes que están excluidas de las vesículas de transporte. La retención puede basarse por lo general en las propiedades físicas de la proteína. Por ejemplo, las proteínas solubles que forman parte de grandes complejos o proteínas de membrana con dominios transmembrana cortos no es probable que entren en una vesícula de transporte.
2. *Recuperación* de moléculas “escapadas” de vuelta al compartimiento en el que normalmente residen.

Las proteínas que normalmente residen en el ER, tanto en la luz como en la membrana, contienen secuencias de aminoácidos cortas en su terminal C que sirven como *señales de recuperación*, asegurando su regreso al ER si se las traslada por accidente al ERGIC o al complejo de Golgi. La recuperación de las proteínas ER “escapadas” de estos compartimientos se logra mediante receptores específicos que capturan las moléculas y las devuelven al ER en vesículas recubiertas con COPI (figuras 8-25, 8-28). Las proteínas solubles residentes en la luz del ER (como la proteína disulfuro isomerasa y las chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento) típicamente poseen la señal de recuperación “lis-asp-glu-leu” (o KDEL en la nomenclatura de un solo boletín).

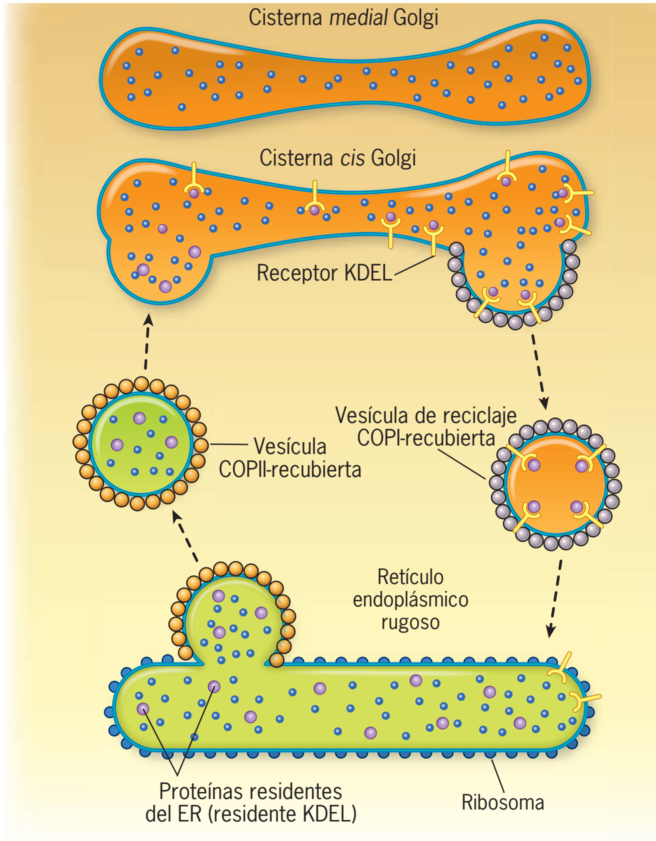



**FIGURA 8-28 Recuperación de proteínas del ER.** Las proteínas residentes del ER contienen secuencias de aminoácidos que conducen a su recuperación del complejo de Golgi si se incorporan por accidente en una vesícula de transporte unida a Golgi. Las proteínas solubles del ER llevan la señal de recuperación KDEL. La recuperación se logra a medida que las proteínas solubles del ER se unen a los receptores KDEL que residen en la pared membranosa de los compartimientos *cis* del Golgi. Los receptores KDEL, a su vez, se unen a las proteínas de la capa de COPI, lo que permite reciclar todo el complejo de nuevo al ER.

Como se muestra en la **FIGURA 8-28**, estas proteínas son reconocidas y devueltas al ER por el *receptor KDEL*, una proteína integral de membrana que se desplaza entre los compartimientos *cis* de Golgi y el ER. Si la secuencia KDEL se elimina de una proteína del ER, las proteínas escapadas no se devuelven al ER sino que se transportan hacia adelante a través del complejo de Golgi. Por el contrario, cuando una célula está genéticamente modificada para expresar una proteína secretora o lisosomal que contiene un KDEL terminal C agregado, esa proteína se devuelve al ER en lugar de enviarse a su destino apropiado. Las proteínas de membrana que residen en el ER también tienen una señal de recuperación que se une a la capa de COPI, lo que facilita su retorno al ER. Las secuencias de recuperación más comunes para proteínas de membrana del ER implican dos residuos básicos muy vinculados entre sí, más comúnmente KKXX (donde K es lisina y X es cualquier residuo). Cada compartimiento de membrana en la ruta biosintética puede tener sus propias señales de recuperación, lo que ayuda a explicar cómo cada compartimiento puede mantener su complemento único de proteínas a pesar del movimiento constante de vesículas dentro y fuera de ese compartimiento.

**REPASO**

1. Contraste las funciones de las vesículas recubiertas con COPI y COPII en el tráfico de proteínas.
2. ¿Cómo las señales de recuperación aseguran que las proteínas se mantengan como residentes de un compartimiento de membrana en particular?

## 8.11 Más allá del complejo de Golgi: clasificación de proteínas en el TGN

A pesar de toda la discusión sobre las vesículas de transporte, todavía tenemos que examinar cómo una proteína particular que se ha sintetizado en el ER está dirigida hacia un destino celular particular. Es importante que una célula sea capaz de distinguir entre las diversas proteínas que fabrica. Una célula pancreática, por ejemplo, tiene que segregar las enzimas digestivas recién sintetizadas que se secretarán en un conducto, desde moléculas de adhesión celular recién sintetizadas que finalmente residirán en la membrana plasmática, a partir de enzimas lisosomales destinadas a los lisosomas. Esto se logra a medida que la célula clasifica las proteínas destinadas a sitios distintos en diferentes portadores unidos a membrana. La red *trans* Golgi (TGN), que es la última parada en el complejo de Golgi, funciona como una importante estación de clasificación, que dirige las proteínas a varios destinos. La mejor comprensión de las vías posGolgi es una que lleva enzimas lisosomales.

### Clasificación y transporte de enzimas lisosomales

Las proteínas lisosomales se sintetizan en ribosomas unidos a la membrana del ER y se transportan al complejo de Golgi junto con otros tipos de proteínas. Una vez en las cisternas de Golgi, las enzimas lisosomales solubles son reconocidas específicamente por las enzimas que catalizan la adición de dos pasos de un grupo fosfato a ciertos azúcares de manosa de las cadenas de carbohidrato ligada a *N* (**FIGURA 8-29*a***). Por tanto, a diferencia de otras glucoproteínas clasificadas en el TGN, las enzimas lisosomales poseen residuos de manosa fosforilados, que actúan como señales de clasificación. Este mecanismo de clasificación de proteínas se descubrió a través de estudios en células de humanos que carecían de una de las enzimas involucradas en la adición de fosfato (discutido en "Perspectiva humana", sección 8.12). Las enzimas lisosomales que portan una señal de manosa 6-fosfato son reconocidas y capturadas por los *receptores de manosa 6-fosfato* (MPR, *mannose 6-phosphate receptors*), que son proteínas integrales de membrana que atraviesan las membranas de TGN (figura 8-29*b*).

Las enzimas lisosomales se transportan desde el TGN en vesículas recubiertas de clatrina (que son el tercer y último tipo de vesículas recubiertas que se discutirán). La estructura de las vesículas recubiertas de clatrina se describe en detalle en la figura 8-40 en relación con la endocitosis, un proceso que se comprende mejor que la gemación en el TGN. Será suficiente en este punto observar que las capas de estas vesículas contienen 1) un enrejado externo compuesto de la proteína clatrina, que forma un andamio estructural, y 2) un caparazón interno compuesto de adaptadores de proteína, que cubre la superficie de la membrana de la vesícula que mira al citosol (**FIGURA 8-30**). El término *adaptador* describe una molécula que vincula físicamente dos o más componentes. Las enzimas lisosomales son escoltadas del TGN por una familia de proteínas adaptadoras llamadas **GGAs**.

Como se indica en el recuadro de la figura 8-30, una molécula de GGA tiene varios dominios, cada uno capaz de captar una proteína diferente implicada en la formación de vesículas. Los extremos exteriores de los adaptadores GGA se unen a las moléculas de clatrina, sosteniendo el andamiaje de clatrina en la su-

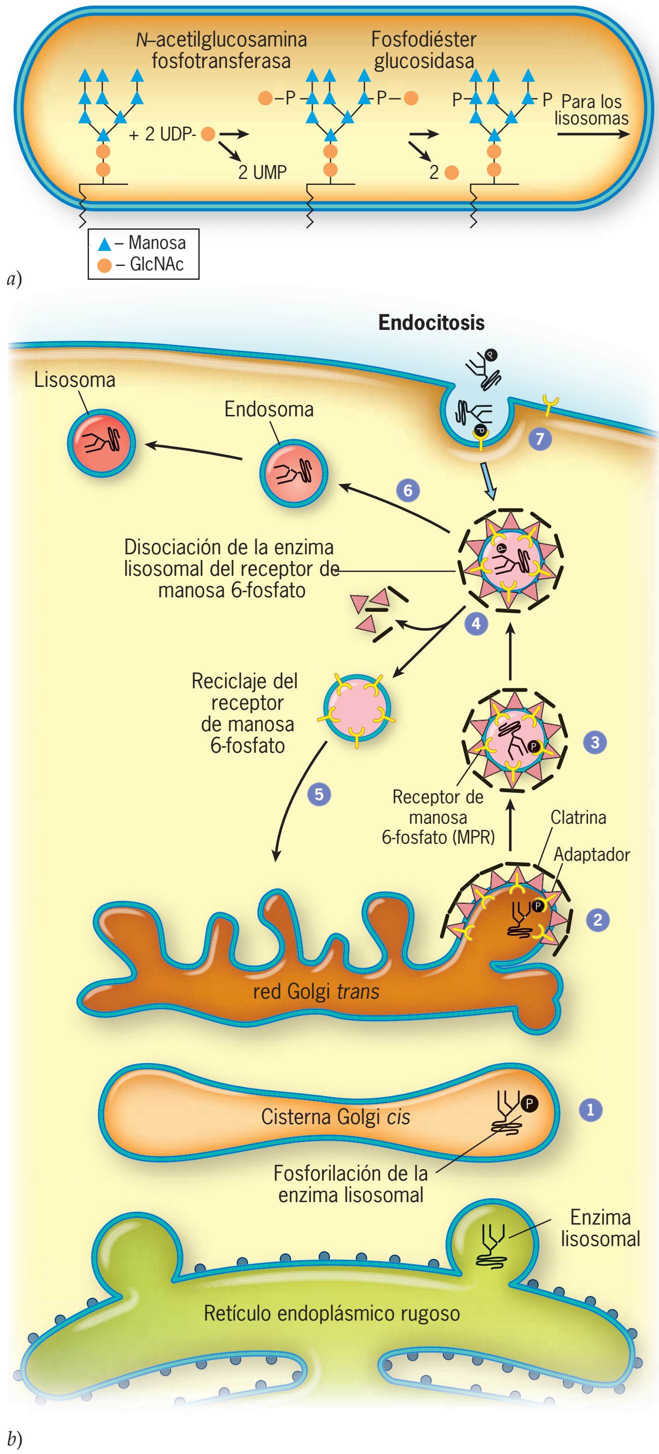



**FIGURA 8-29 Dirigiendo las enzimas lisosomales a los lisosomas.** *a*) Las enzimas lisosomales son reconocidas por una enzima en las cisternas *cis* que transfiere una *N*-acetilglucosamina fosforilada de un donador de azúcar de nucleótido a uno o más residuos de manosa de oligosacáridos unidos por *N*. El resto de glucosamina se elimina luego en un segundo paso mediante una segunda enzima, dejando residuos de manosa-6-fosfato como parte de la cadena de oligosacáridos. *b*) Diagrama esquemático que muestra las rutas seguidas por una enzima lisosomal (negra) desde su sitio de síntesis en el ER hasta su entrega a un lisosoma. Los residuos de manosa de la enzima lisosomal se fosforilan en las cisternas de Golgi (paso 1) y luego se incorporan de forma selectiva en una vesícula recubierta de clatrina en la TGN (paso 2). Se cree que los receptores de manosa 6-fosfato tienen una doble función (paso 3): interactúan con las enzimas lisosomales en el lado luminal de la vesícula e interactúan con adaptadores en la superficie citosólica de la vesícula (se muestra en la figura 8-30). Los receptores de manosa 6-fosfato se separan de las enzimas (paso 4) y se devuelven al complejo de Golgi (paso 5). Las enzimas lisosomales se entregan a un endosoma (paso 6) y por último a un lisosoma. Los receptores de manosa 6-fosfato también están presentes en la membrana plasmática, donde capturan las enzimas lisosomales que se secretan en el espacio extracelular y devuelven las enzimas a una vía que las dirige a un lisosoma (paso 7).

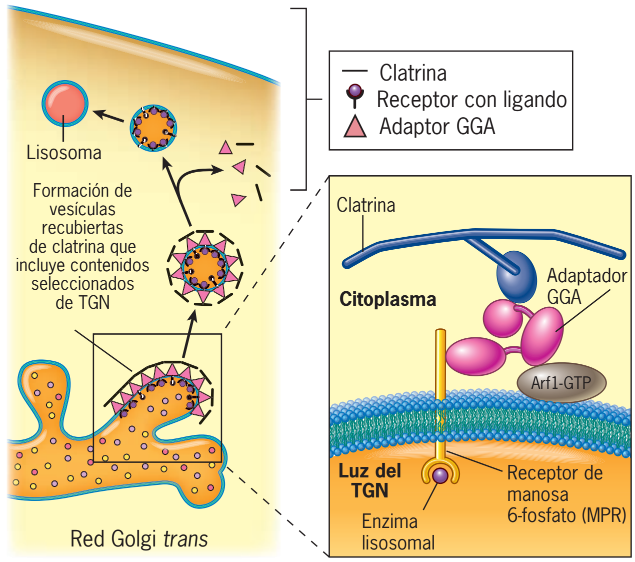



**FIGURA 8-30 La formación de vesículas recubiertas de clatrina en la TGN.** Las vesículas recubiertas de clatrina que brotan de la TGN contienen GGA, una proteína adaptadora que consta de varios dominios distintos. Uno de los dominios de GGA se une a los dominios citosólicos de las proteínas de membrana, incluidos los que finalmente residirán en la membrana límite del lisosoma y también la MPR que transporta las enzimas lisosomales. Otros dominios de GGA se unen a Arf1 y a la red citosólica circundante de moléculas de clatrina.

perficie de la vesícula. En su superficie interna, los adaptadores GGA se unen a una señal de clasificación en las colas citosólicas de los receptores de manosa 6-fosfato. Los MPR, a su vez, se unen a enzimas lisosomales solubles dentro de la luz de la vesícula (figura 8-30, recuadro). Como resultado de estas interacciones con los adaptadores de GGA, los MPR en la membrana de TGN y las enzimas lisosomales dentro de la luz de TGN se concentran en vesículas recubiertas de clatrina. Al igual que en la formación de vesículas COPI y COPII, la producción de vesículas recubiertas con clatrina en el TGN comienza con el reclutamiento a la membrana de una pequeña proteína unida a GTP, en este caso Arf1, que establece el escenario para la unión de las otras proteínas de la cubierta. Al igual que Sar1 (figura 8-26), Arf1 amplía una hélice α doblada de membrana que actúa junto con proteínas adaptadoras para unir clatrina e iniciar la formación de la vesícula en gemación. Después de que la vesícula haya brotado del TGN, el revestimiento de clatrina se pierde y la vesícula sin recubrimiento pasa a su destino, que puede ser un endosoma temprano, un endosoma tardío o una vacuola vegetal. Antes de que lleguen a uno de estos organelos, los MPR se disocian de las enzimas lisosomales y regresan al TGN (figura 8-29*b*) para otra ronda de transporte de enzimas lisosomales.

## Clasificación y transporte de proteínas no lisosomales

Las proteínas lisosomales no son los únicos materiales que se exportan del TGN. Como se indica en la figura 8-2, las proteínas de membrana destinadas a la membrana plasmática y los materiales de secreción destinados a la exportación desde la célula también se transportan desde la TGN, pero los mecanismos son poco conocidos. Según un modelo, los portadores membranosos se producen como los fragmentos de TGN en vesículas y túbulos de diversos tamaños y formas. Este concepto se ajusta al modelo de maduración cisternal, que propone que las cisternas del complejo de Golgi se muevan de forma continua hacia la TGN, donde tendrían que dispersarse para permitir la maduración continua de la pila de Golgi. Las proteínas que se descargan de la célula mediante un proceso de secreción regulada, como las enzimas digestivas y las hormonas, se cree que forman agregados selectivos que eventualmente quedan contenidos en grandes gránulos secretores densamente empaquetados. Estos agregados, que están aparentemente atrapados como gránulos secretores inmaduros, brotan de los bordes de las cisternas *trans* de Golgi y de la TGN. En algunas células, se observa que los túbulos largos se extraen de la TGN por las proteínas motoras que operan a lo largo de las vías microtubulares. Estos túbulos se dividen en varias vesículas o gránulos por fisión de membrana. Una vez que se han separado de la TGN, los contenidos de los gránulos secretores se vuelven más concentrados. Al final, los gránulos maduros se almacenan en el citoplasma hasta que se liberan sus contenidos después de la estimulación de la célula por una hormona o impulso nervioso.

La entrega dirigida de proteínas integrales a la membrana plasmática parece estar basada por lo general en señales de clasificación en los dominios citoplásmicos de las proteínas de membrana. Una considerable investigación se ha centrado en las células polarizadas, como las que se muestran en la figura 8-11. En estas células, las proteínas de membrana destinadas a residir en la porción apical de la membrana plasmática contienen diferentes señales de clasificación de las destinadas a la porción lateral o basal. Estos dos grupos de proteínas de la membrana plasmática se agrupan en diferentes dominios de membrana TGN y se transportan a la superficie celular en portadores separados. Las proteínas de membrana plasmática de células no polarizadas, como fibroblastos y glóbulos blancos, pueden no requerir señales de clasificación especiales. Dichas proteínas pueden transportarse simplemente desde el TGN a la superficie celular en vesículas de la vía secretora constitutiva (figura 8-2*b*).

### REPASO

1. Describa los pasos que aseguran que una enzima lisosomal se dirigirá a un lisosoma en lugar de a una vesícula secretora. ¿Cuál es el papel de las proteínas GGA?

# 8.12 PERSPECTIVA HUMANA

## Trastornos resultantes de defectos en la función lisosomal

Nuestra comprensión de los mecanismos por los que las proteínas se dirigen a determinados organelos comenzó con el descubrimiento de que los residuos de manosa-6-fosfato en las enzimas lisosomales actúan como una "dirección" para el suministro de estas proteínas a los lisosomas. El descubrimiento de la dirección del lisosoma se realizó en estudios de pacientes con una condición hereditaria rara y fatal conocida como enfermedad de célula I. Muchas células en estos pacientes contienen lisosomas que están hinchados con materiales no degradados. Los materiales se acumulan en los lisosomas debido a la ausencia de enzimas hidrolíticas. Cuando los fibroblastos de estos pacientes se estudiaron en cultivo, se descubrió que las enzimas

lisosomales se sintetizan a niveles normales, pero se secretan en el medio y no se dirigen a los lisosomas. Un análisis adicional reveló que las enzimas secretadas carecían de los residuos de fosfato de manosa que están presentes en las enzimas lisosomales de las células de individuos normales. El defecto de las células I se localizaba rápidamente a la deficiencia de una enzima (*N*-acetilglucosamina fosfotransferasa) requerida para la fosforilación de manosa en el complejo de Golgi (véase figura 8-29a).

En 1965, H. G. Hers de la Universidad de Lovaina en Bélgica ofreció una explicación sobre cómo la ausencia de una enzima lisosomal insignificante en apariencia, la α-glucosidasa, podría conducir al desarrollo de una enfermedad hereditaria fatal conocida como enfermedad de Pompe. Hers sugirió que, en ausencia de alfaglucosidasa, el glucógeno no digerido se acumulaba en los lisosomas, causando hinchazón de los organelos y daño irreversible a las células y tejidos. Las enfermedades de este tipo, caracterizadas por la deficiencia de una sola enzima lisosomal y la correspondiente acumulación de sustrato no degradado (**FIGURA 1**), se denominan **trastornos de almacenamiento lisosomal**. Se han descrito más de 40 de estas enfermedades, que afectan casi a uno de cada 5 000 bebés. Las enfermedades que resultan de una acumulación de esfingolípidos no degradados se enumeran en la tabla 1. Los síntomas de las enfermedades de almacenamiento lisosomal pueden variar desde muy graves hasta apenas detectables, dependiendo en lo fundamental del grado de disfunción de la enzima. Varias enfermedades también se han rastreado a mutaciones en las proteínas de la membrana lisosomal que impiden el transporte de sustancias desde la luz del lisosoma al citosol.

Entre las enfermedades de almacenamiento lisosomal mejor estudiadas se encuentra la enfermedad de Tay-Sachs, que resulta de una deficiencia de la enzima β-*N*-hexosaminidasa A, una enzima que degrada el gangliósido $G_{M2}$ (figura 4-6). $G_{M2}$ es un componente principal de las membranas de las células cerebrales, y en ausencia de la enzima hidrolítica, el gangliósido se acumula en los lisosomas hinchados de las células cerebrales (figura 1), causando disfunción. En su forma severa, que ataca durante la infancia, la enfermedad se caracteriza por retraso mental y motriz progresivo, así como anormalidades esqueléticas, cardiacas y respiratorias. La enfermedad es muy rara en la población general, pero alcanzó una incidencia de hasta 1 en 3 600 recién nacidos entre los judíos de ascendencia europea oriental. La incidencia de la enfermedad ha disminuido de forma drástica la cantidad de habitantes en esta población étnica en los últimos años como resultado de la identificación de los portadores, el asesoramiento genético de los padres en situación de riesgo y el diagnóstico prenatal mediante la amniocentesis. De hecho, todas las enfermedades conocidas de almacenamiento lisosomal se pueden diagnosticar prenatalmente.

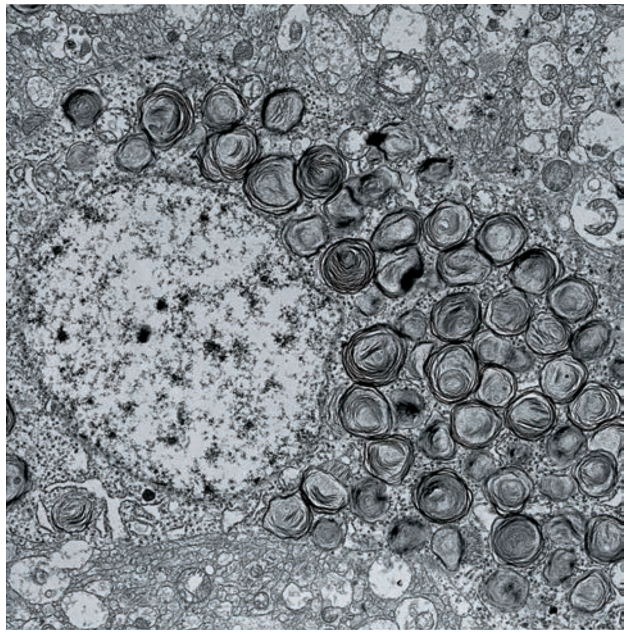


**FIGURA 1 Trastornos de almacenamiento lisosomales.** Micrografía electrónica de una sección a través de una porción de una neurona de una persona con una enfermedad de almacenamiento lisosomal caracterizada por una incapacidad para degradar los gangliósidos $G_{M2}$. Estas vacuolas citoplasmáticas tiñen tanto las enzimas lisosomales como el gangliósido, lo que indica que son lisosomas en los que se han acumulado glucolípidos no digeridos.

FUENTE: Cortesía de Kinuko Suzuki.

En los últimos años, las perspectivas para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosomal han mejorado con la demostración de que los síntomas de la enfermedad de Gaucher, una deficiencia de la enzima lisosomal glucocerebrosidasa, pueden aliviarse mediante la *terapia de reemplazo enzimático*. Los bebés con la enfermedad de Gaucher acumulan grandes cantidades de lípidos de glucocerebrósidos en los lisosomas de sus macrófagos, causando agrandamiento del bazo y anemia. Intentos iniciales para corregir la enfermedad mediante la infusión de una solución de la enzima humana normal en el torrente sanguíneo no tuvieron éxito porque la enzima fue absorbida por las células del hígado, que no se ven bastante afectadas

**TABLA 1 Enfermedades de almacenamiento de esfingolípidos**

| Enfermedad | Deficiencia de enzimas | Sustancia de almacenamiento principal | Consecuencias |
|---|---|---|---|
| Gangliosidosis $G_{M1}$ | $G_{M1}$ betagalactosidasa | Gangliósido $G_{M1}$ | Retraso mental, agrandamiento del hígado, afectación esquelética, muerte a los 2 años |
| Enfermedad de Tay-Sachs | Hexosaminidasa A | Gangliósido $G_{M2}$ | Retraso mental, ceguera, muerte a los 3 años |
| Enfermedad de Fabry | Alfagalactosidasa A | Trihexosilceramida | Erupción cutánea, insuficiencia renal, dolor en extremidades inferiores |
| Enfermedad de Sandhoff | Hexosaminidasas A y B | Gangliósido $G_{M2}$ y globósido | Similar a la enfermedad de Tay-Sachs pero progresando más rápidamente |
| Enfermedad de Gaucher | Glucocerebrosidasa | Glucocerebrósido | Agrandamiento de hígado y bazo, erosión de huesos largos, retraso mental solo en forma infantil |
| Enfermedad de Niemann-Pick | Esfingomielinasa | Esfingomielina | Aumento de hígado y bazo, retraso mental |
| Lipogranulomatosis de Farber | Ceramidasa | Ceramida | Articulaciones dolorosas y deformadas de manera progresiva, nódulos cutáneos, muerte en pocos años |
| Enfermedad de Krabbe | Galactocerebrosidasa | Galactocerebrósido | Pérdida de mielina, retraso mental, muerte a los 2 años |
| Lipidosis de sulfatida | Arilsulfatasa A | Sulfatida | Retraso mental, muerte en la primera década |

(*continúa*)

por la deficiencia. Para dirigirse a los macrófagos, la enzima se purificó de tejido placentario humano y se trató con tres glucosidasas diferentes para eliminar los azúcares terminales en las cadenas de oligosacáridos de la enzima, que expusieron los residuos de manosa subyacentes (véase figura 8-22). Después de la infusión en el torrente sanguíneo, esta enzima modificada (comercializada bajo el nombre de Cerezyme) es reconocida por los receptores de manosa en la superficie de los macrófagos y se absorbe de manera rápida por endocitosis mediada por receptor (sección 8.17). Debido a que los lisosomas son el sitio blanco natural de los materiales introducidos en el macrófago por endocitosis, las enzimas se administran eficientemente a los sitios precisos en la célula donde se manifiesta la deficiencia. Miles de víctimas de esta enfermedad han sido tratados con éxito de esta manera. La terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de muchas otras enfermedades de almacenamiento lisosomal ha sido aprobada o está siendo investigada en ensayos clínicos. (La película *Medidas extraordinarias* se basa en la búsqueda de una enzima de reemplazo para tratar la enfermedad de Pompe). Desafortunadamente, muchas de estas enfermedades afectan el sistema nervioso central, que no puede absorber las enzimas circulantes debido a la barrera hematoencefálica (página 248).

Un enfoque alternativo, denominado terapia de reducción de sustrato, usa medicamentos de bajo peso molecular para inhibir la síntesis de las sustancias que se acumulan en la enfermedad. Miglustat (nombre comercial Zavesca), que inhibe de forma parcial la biosíntesis de glucoesfingolípidos, se ha utilizado con éxito para tratar la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Niemann-Pick tipo C. Al final, se puede observar que, aunque va acompañado de un riesgo considerable para el paciente, el trasplante de médula ósea (o de sangre del cordón umbilical) ha demostrado ser relativamente exitoso en el tratamiento de algunas de estas enfermedades. Se cree que las células extrañas, que contienen copias normales del gen en cuestión, secretan una cantidad limitada de la enzima lisosomal normal. Algunas de estas moléculas de enzimas son absorbidas por las propias células del paciente, lo que disminuye el impacto de la deficiencia de la enzima.

## 8.13 Dirigir vesículas a un compartimiento particular

La fusión de vesículas requiere interacciones específicas entre diferentes membranas. Las vesículas del ER, por ejemplo, se fusionan con la red ERGIC o *cis* de Golgi y no con una cisterna *trans*. La fusión selectiva es uno de los factores que asegura un flujo dirigido a través de los compartimientos membranosos de la célula. A pesar de un gran esfuerzo de investigación, todavía no comprendemos por completo los mecanismos por los cuales las células dirigen las vesículas a los compartimientos particulares. Se cree que una vesícula contiene proteínas específicas asociadas con su membrana que rigen los movimientos y el potencial de fusión de esa vesícula. Para comprender la naturaleza de estas proteínas, consideraremos los pasos que se dan entre las etapas de la creación de vesículas y la fusión de vesículas.

1. ***Movimiento de la vesícula hacia el compartimiento blanco específico.*** En muchos casos, las vesículas membranosas deben moverse distancias considerables a través del citoplasma antes de alcanzar su objetivo final. Estos tipos de movimiento están mediados en gran parte por microtúbulos y sus proteínas motoras asociadas, que actúan de manera análoga a un sistema ferroviario que transporta carga a lo largo de trayectorias definidas hacia destinos predeterminados. Se observó que los portadores membranosos observados en la figura 8-19, por ejemplo, se movían desde el ERGIC al complejo de Golgi sobre los microtúbulos.
2. ***Anclar las vesículas al compartimiento blanco.*** Se cree que los contactos iniciales entre una vesícula de transporte y su membrana blanco, como una cisterna de Golgi, están mediados por una diversa colección de proteínas "de anclaje". Se han descrito dos grupos de proteínas de anclajes (**FIGURA 8-31*a***): proteínas fibrosas en forma de bastón que son capaces de formar un puente molecular entre las dos membranas a una distancia considerable (50-200 nm) y grandes complejos multiproteicos que parecen mantener las dos membranas en una proximidad más cercana. Las diferentes proteínas de anclaje inician la fusión entre distintos tipos de membranas. Por ejemplo, una clase de proteínas de anclaje fibroso, llamadas golginas, actúan dentro y alrededor del complejo de Golgi. Entre varias funciones propuestas, las golginas pueden servir como "tentáculos" para alcanzar y capturar las vesículas de transporte que trasladan carga unida a Golgi. Varios complejos de anclaje diferentes se han visualizado con el microscopio electrónico. La figura 8-31*b*) muestra imágenes tomográficas de la zona presináptica de un terminal nervioso de mamífero. Estas imágenes en 3D revelan la presencia de estructuras filamentosas, presumiblemente construidas a partir de proteínas de anclaje que conectan entre sí a las vesículas sinápticas y con la membrana plasmática adyacente, con la cual esas vesículas se habrían fusionado. Gran parte de la especificidad entre la vesícula y el objetivo puede ser conferida por una familia de pequeñas proteínas G llamadas **Rab**, que ciclan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GTP. Las Rab unidas a GTP se asocian con membranas mediante un ancla lipídica. Con más de 60 genes Rab diferentes identificados en humanos, estas proteínas constituyen el grupo más diverso de proteínas involucradas en el tráfico de membranas. Más importante aún, diferentes Rab se asocian con distintos compartimientos de membrana. Esta localización preferencial otorga a cada compartimiento una identidad de superficie única, que se requiere para reclutar las proteínas implicadas en la especificidad de direccionamiento. En su estado unida a GTP, las Rab desempeñan un papel clave en la selección de vesículas al reclutar proteínas de anclaje citosólicas específicas para superficies de membrana específicas (figura 8-31*a*). Las Rab también desempeñan un papel clave en el reclutamiento de numerosas proteínas involucradas en otros aspectos del tráfico de membranas, incluidas las proteínas motoras que mueven las vesículas membranosas a través del citoplasma (como se muestra en la figura 9-52*c*).
3. ***Acoplamiento de vesículas en el compartimiento blanco.*** En algún momento durante el proceso que conduce a la fusión de vesículas, las membranas de la vesícula y el compartimiento objetivo entran en contacto íntimo entre sí como resultado de una interacción entre las regiones citosólicas de las proteínas integrales de las dos membranas. Las proteínas clave que participan en estas interacciones se llaman **SNARE**, y constituyen una familia de más de 35 proteínas de membrana cuyos miembros están localizados en compartimientos subcelulares específicos. Aunque las **SNARE** varían de modo considerable en estructura y tamaño, todos contienen un segmento en su dominio citosólico llamado *motivo* SNARE que consta de 60-70 aminoácidos capaces de formar un complejo con otro motivo SNARE. Las SNARE se pueden dividir funcionalmente en dos categorías, **v-SNARE**, que se incorporan a las membranas de las vesículas de transporte durante la gemación, y **t-SNARE**, que se localizan en las membranas de los compartimientos blanco (figura 8-31*c*). Las SNARE mejor estudiadas son aquellas que median en el acoplamiento de vesículas sinápticas con la membrana presináptica durante la liberación regulada de neurotransmisores (página 163). En este caso, la

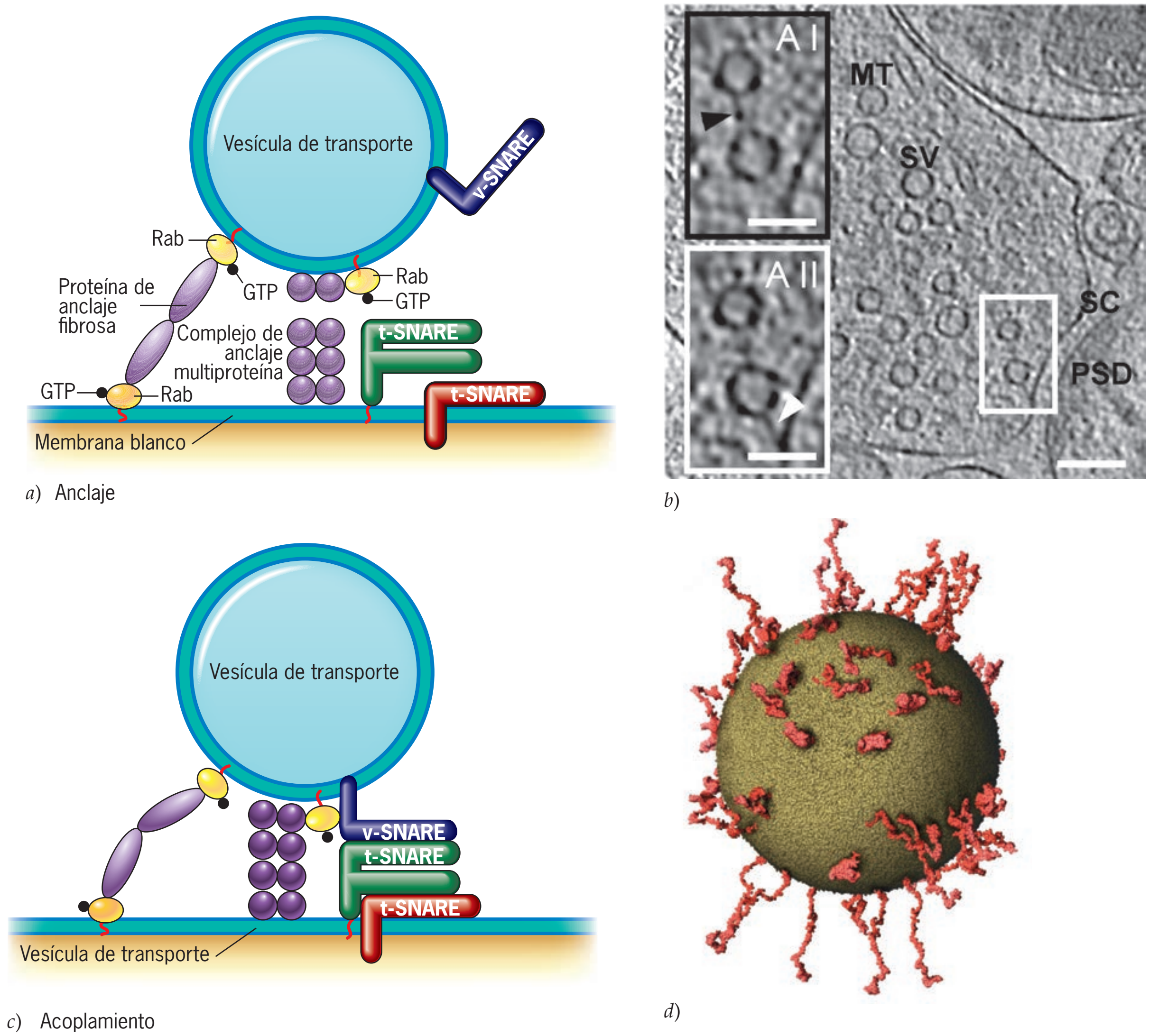
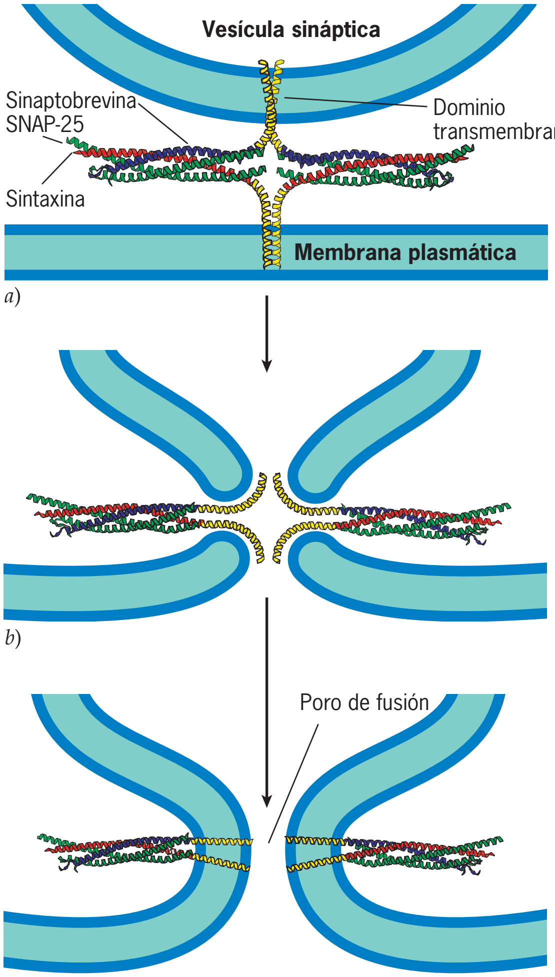
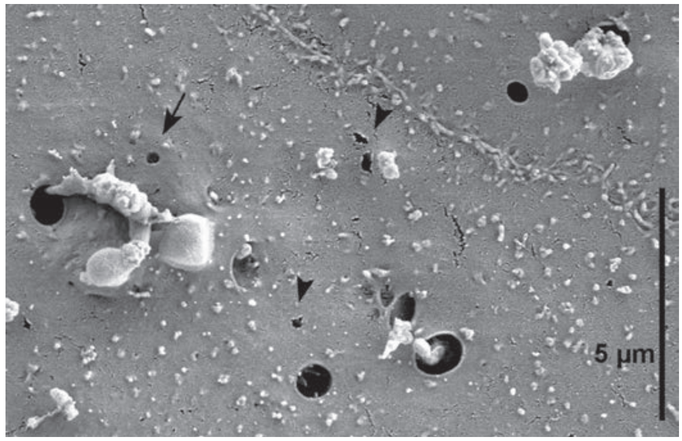



**FIGURA 8-31 Pasos propuestos para dirigir las vesículas de transporte a las membranas blanco.** *a*) De acuerdo con este modelo, las proteínas Rab en la vesícula y la membrana blanco están involucradas en el reclutamiento de proteínas de anclaje que median el contacto inicial entre las dos membranas. Se describen dos tipos de proteínas de anclaje: proteínas fibrosas altamente alargadas (p. ej., golginas y EEA1) y complejos multiproteicos (p. ej., el exocito y TRAPPI). *b*) Imagen de tomografía de electrones de un corte a través de un extremo del nervio de mamífero que muestra la red de vesículas sinápticas que están presentes en estrecha asociación con la membrana plasmática presináptica (sección 4.18). Las inserciones de la izquierda (que corresponden a la caja blanca de la derecha) muestran la presencia de conectores filamentosos entre un par de vesículas sinápticas (inserción superior) y entre una de las vesículas sinápticas y la membrana plasmática adyacente (inserción inferior). Barras: panel principal, 100 *nm*; inserciones, 50 *nm*. *c*) Durante la etapa de acoplamiento que conduce a la fusión de la membrana, a v-SNARE en la membrana de la vesícula interactúa con los t-SNARE en la membrana blanco para formar un haz alfahelicoidal de cuatro haces que pone las dos membranas en contacto íntimo (véase próxima figura). En los casos descritos en el texto, SNAP-25, uno de las t-SNARE, es una proteína de membrana periférica que se une a la bicapa lipídica mediante un anclaje lipídico en lugar de un dominio transmembrana. SNAP-25 aporta dos hélices al paquete SNARE de cuatro hélices. *d*) Un modelo de una vesícula sináptica que muestra la distribución de una sola de sus proteínas constituyentes, la sinaptobrevina v-SNARE. La densidad de superficie y las estructuras de las moléculas de sinaptobrevina se basan en cálculos del número de estas proteínas por vesícula y la estructura conocida de la molécula. En la imagen de la figura 4-4*b*) se muestra un retrato completo de las proteínas en la superficie de una vesícula sináptica.

FUENTE: *b*) Tomada de Rubén Fernández-Busnadiego, *et al*. Cortesía de Wolfgang Baumeister. *J Cell Biol* 2010;188,147, reproducida con permiso de The Rockefeller University Press; *d*) De Shigeo Takamori, *et al*. *Cell* 2006;127:841, cortesía de Reinhard Jahn, con permiso de Elsevier.

membrana plasmática de la célula nerviosa contiene dos t-SNARE, sintaxina y SNAP-25, mientras que la membrana de la vesícula sináptica contiene una sola v-SNARE, sinaptobrevina. La distribución de las moléculas de sinaptobrevina en una vesícula sináptica representativa se muestra en la figura 8-31*d*). A medida que la vesícula sináptica y la membrana presináptica se aproximan entre sí, los motivos SNARE de las moléculas t- y v-SNARE de las membranas adyacentes interaccionan para formar cuatro haces trenzados, como se muestra en la **FIGURA 8-32*a*)**. Cada haz consta de cuatro alfahélices, dos donadas por SNAP-25 y una donada por sintaxina y sinaptobrevina. Estas hélices α paralelas se unen para formar un complejo estrechamente entrelazado que atrae a las dos bicapas lipídicas asociadas en una asociación muy estrecha [figuras 8-31*c*) y 8-32*a*)]. La formación de cuatro fascículos helicoidales estrangulados similares ocurre entre otras SNARE en otros sitios a lo largo de la célula, dondequiera que las membranas estén destinadas a fusionarse. Es interesante observar que los SNARE de la vesícula sináptica y la membrana presináptica son los objetivos de dos de las toxinas bacterianas más potentes: las responsables del botulismo y el tétanos. Estas toxinas mortales actúan como proteasas cuyos únicos




*d*)

**FIGURA 8-32 Un modelo de las interacciones entre v- y t-SNARE que conduce a la fusión de la membrana y la exocitosis.** *a*) La vesícula sináptica se ha acoplado a la membrana plasmática a través de la formación de haces de cuatro hebras que comprenden hélices α donadas por sintaxina (rojo), sinaptobrevina (azul) y SNAP-25 (verde). SNAP-25 aporta dos hélices y carece de un dominio transmembrana (amarillo). *b*) Un estado de transición especulativo en la fusión de las dos membranas. Se muestra una pequeña cavidad llena de agua en el centro del haz de hélice transmembrana. *c*) Las hélices transmembrana que antes residían en las dos membranas separadas están ahora presentes en la misma bicapa, y se ha abierto un poro de fusión entre la vesícula y la membrana blanco. El contenido de neurotransmisores de la vesícula ahora puede ser descargado por exocitosis. *d*) Micrografía electrónica de barrido de la superficie extracelular de un par de células cultivadas alveolares (pulmonares) estimuladas para descargar proteínas que se habían almacenado en gránulos secretores. El material se ve expulsado de la célula a través de aberturas circulares lisas que se presume son poros de fusión dilatados. La flecha muestra un poro de fusión que no se ha dilatado, que se distingue fácilmente de los agujeros (punta de flecha) formados por accidente durante la preparación de la muestra.

FUENTE: *a-c*) Reimpreso de Pehr A. B. Harbury. *Estructura* 1998;6:1490, con permiso de Elsevier. *d*) de Thomas Haller, *et al*. *J Cell Biol* 2001;155:286; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

sustratos conocidos son SNARE. La escisión de las SNARE neuronales por las toxinas bloquea la liberación de neurotransmisores, lo que causa la parálisis.

4. ***Fusión entre las vesículas y las membranas objetivo.*** Cuando las vesículas lipídicas artificiales (liposomas) que contienen t-SNARE purificadas se mezclan con liposomas que contienen v-SNARE purificadas, los dos tipos de vesículas se fusionan entre sí, pero no entre ellas mismas. Este hallazgo indica que las interacciones entre t- y v-SNARE son capaces de unir dos bicapas de lípidos con suficiente fuerza para hacer que se fusionen (figura 8-32*b, c*). Sin embargo, un gran cuerpo de evidencia sugiere que, aunque la interacción entre v- y t-SNARE es necesaria para la fusión de la membrana, no es suficiente por sí mismo para provocar la fusión *dentro de una célula*. De acuerdo con la opinión prevaleciente con respecto a la secreción regulada de moléculas de neurotransmisores, el paquete de cuatro cadenas SNARE permanece bloqueado en un estado detenido por interacción con proteínas accesorias. Las vesículas en esta etapa permanecen atracadas en la membrana y listas para descargar sus contenidos casi instantáneamente una vez que reciben una señal de activación en forma de aumento de la concentración de $Ca^{2+}$ (como se explica más adelante). Independientemente de cómo esté regulado, una vez que las bicapas lipídicas de las dos membranas se fusionan, las SNARE que antes se proyectaban desde membranas separadas ahora residen en la misma membrana (figura 8-32*c*). La disociación del complejo SNARE de cuatro cadenas se logra mediante una proteína citosólica en forma de anillo llamado NSF que se une al paquete SNARE y, usando la energía de la hidrólisis de ATP, lo desvincula.

Ahora que hemos descrito los eventos que ocurren durante la fusión de una vesícula con una membrana blanco, podemos volver a la pregunta: ¿cómo se determina la especificidad de esta interacción? De acuerdo con el consenso actual, la capacidad de fusión de una vesícula y una membrana blanco particular está determinada por la combinación específica de proteínas que interactúan, que incluyen proteínas de anclaje, Rab y SNARE que pueden ensamblarse en ese sitio en la célula. En conjunto, estas interacciones múltiples entre varios tipos de proteínas proporcionan un alto nivel de especificidad, asegurando que cada compartimiento de membrana pueda ser reconocido de forma selectiva.

**REPASO**

1. ¿Qué determina la especificidad de la interacción entre una vesícula de transporte y el compartimiento de la membrana con la que se fusionará? ¿Cómo están involucradas las proteínas SNARE en el proceso de fusión de membranas?

## 8.14 Exocitosis

La fusión de una vesícula secretora o gránulo secretor con la membrana plasmática y posterior descarga de su contenido se llama **exocitosis**. La exocitosis tal vez se produce de forma continua en la mayoría de las células, ya que las proteínas y otros materiales se entregan a la membrana plasmática y al espacio extracelular. Sin embargo, los ejemplos mejor estudiados de exocitosis son aquellos que ocurren durante la secreción regulada, especialmente la libe-

ración de neurotransmisores en la hendidura sináptica. En estos casos, la fusión de la membrana produce una abertura a través de la cual el contenido de la vesícula o gránulo se libera en el espacio extracelular. Se observó en la sección 4.18 que la llegada de un impulso nervioso al axón terminal de una neurona conduce a un aumento en la afluencia de $Ca^{2+}$ y la posterior descarga de moléculas de neurotransmisores por exocitosis. En este caso, la fusión está regulada por una proteína de enlace de calcio (sinaptotagmina) presente en la membrana de la vesícula sináptica. En otros tipos de células, la exocitosis por lo general se desencadena por la liberación de $Ca^{2+}$ desde las reservas citoplásmicas. Se cree que el contacto entre la vesícula y las membranas plasmáticas conduce a la formación de un "poro de fusión" reducido y con proteínas reducidas (figura 8-32*c*). Algunos poros de fusión pueden volver a cerrarse, pero en la mayoría de los casos, el poro se dilata de manera rápida para formar una abertura para la descarga de los contenidos de la vesícula (figura 8-32*d*). Independientemente del mecanismo, cuando una vesícula citoplásmica se fusiona con la membrana plasmática, la superficie luminal de la membrana vesicular se convierte en parte de la superficie externa de la membrana plasmática, mientras que la superficie citosólica de la membrana vesicular se convierte en parte de la superficie interna (citosólica) de la membrana plasmática (figura 8-14).

**REPASO**

1. ¿Cambios de concentración de qué ion desencadenan la exocitosis? ¿De dónde se originan estos iones en las neuronas y en otros tipos de células?

## 8.15 Lisosomas

Los lisosomas son organelos digestivos de una célula animal. Un lisosoma típico contiene al menos 50 enzimas hidrolíticas diferentes (tabla 8-1) producidas en el ER rugoso y dirigidas a estos organelos. En conjunto, las enzimas lisosomales pueden hidrolizar virtualmente todo tipo de macromolécula biológica. Las enzimas de un lisosoma comparten una propiedad importante: todas tienen su actividad óptima a un pH ácido y, por tanto, son **hidrolasas ácidas**. El pH óptimo de estas enzimas es adecuado para el pH bajo del compartimiento lisosomal, que es de casi 4.6. La concentración de protón interna ácida se mantiene mediante una bomba de protones (un tipo V $H^+$-ATPasa, página 154) presente en la membrana límite del organelo. Las membranas lisosomales también contienen una variedad de proteínas integrales altamente glucosiladas cuyas cadenas de carbohidratos se cree que forman un revestimiento protector que protege a la membrana del ataque de las enzimas encerradas.

Aunque los lisosomas albergan una colección predecible de enzimas, su apariencia en micrografías electrónicas no es distintiva ni uniforme. La **FIGURA 8-33** muestra una pequeña porción de una célula de Kupffer, una célula fagocítica en el hígado que envuelve los glóbulos rojos envejecidos. Los lisosomas de una célula de Kupffer exhiben una forma irregular y una densidad de electrones variable, lo que demuestra lo difícil que es identificar estos organelos sobre la base solo de la morfología.

La presencia dentro de una célula de lo que es, en esencia, una bolsa de enzimas destructivas sugiere una serie de posibles funciones. El papel mejor estudiado de los lisosomas es la descomposición de los materiales traídos a la célula desde el entorno extracelular. Muchos organismos unicelulares individuales ingieren partículas de alimentos, que luego se desensamblan enzimáticamente en un lisosoma. Los nutrientes resultantes pasan a través de la membrana lisosomal hacia el citosol. En los mamíferos, las células fagocíticas, como los macrófagos y los neutrófilos, funcionan como carroñeros que ingieren desechos y microorganismos potencialmente peligrosos (sección 8.20). Las bacterias ingeridas generalmente se inactivan por el pH bajo del lisosoma y luego se digieren enzimáticamente. Como se muestra en la figura 17-24, los péptidos producidos por este proceso digestivo se

**TABLA 8-1 Un muestreo de enzimas lisosomales**

| Enzima | Sustrato |
|---|---|
| Fosfatasas | |
| Fosfatasa ácida | Fosfomonoésteres |
| Fosfodiesterasa ácida | Fosfodiésteres |
| Nucleasas | |
| Ribonucleasa ácida | RNA |
| Desoxirribonucleasa ácida | DNA |
| Proteasas | |
| Catepsina | Proteínas |
| Colagenasa | Colágeno |
| GAG-enzimas hidrolizantes | |
| Iduronato sulfatasa | Sulfato de dermatán |
| Betagalactosidasa | Sulfato de keratán |
| Heparán *N*-sulfatasa | Sulfato de heparán |
| Alfa *N*-Acetilglucosaminidasa | Sulfato de heparán |
| Polisacaridasas y oligosacaridasas | |
| Alfaglucosidasa | Glucógeno |
| Fucosidasa | Fucosiloligosacáridos |
| Alfamanosidasa | Manosiloligosacárido |
| Sialidasa | Sialiloligosacáridos |
| Esfingolípidos hidrolizando enzimas | |
| Ceramidasa | Ceramida |
| Glucocerebrosidasa | Glucosilceramida |
| Betahexosaminidasa | Gangliósido $G_{M2}$ |
| Arilsulfatasa A | Galactosilsulfatida |
| Enzimas hidrolizantes de lípidos | |
| Lipasa ácida | Triacilgliceroles |
| Fosfolipasa | Fosfolípidos |

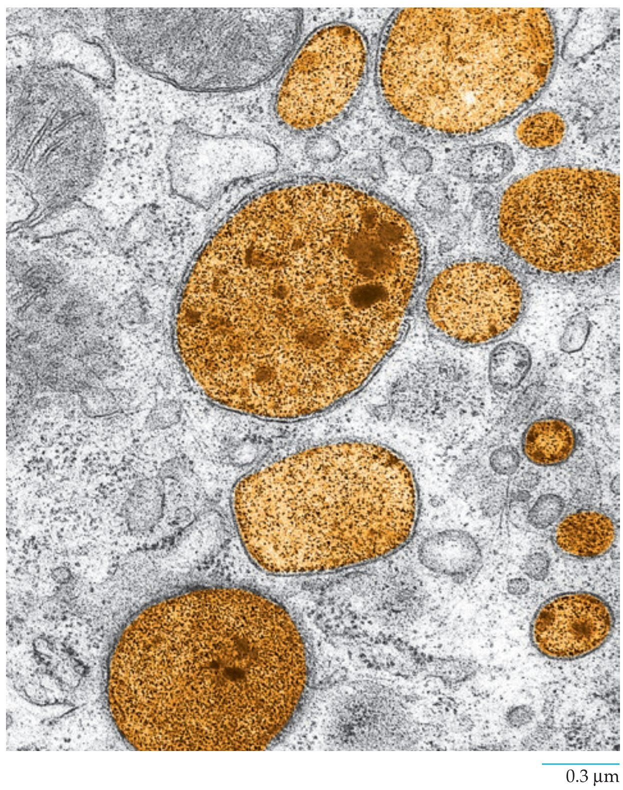



**FIGURA 8-33 Lisosomas.** Porción de una célula de Kupffer fagocítica del hígado que muestra al menos 10 lisosomas de tamaño muy variable.
FUENTE: de Hans Glaumann, *et al. J Cell Biol* 1975;67:887; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.



**FIGURA 8-34 Autofagia.** Micrografía electrónica de una mitocondria y peroxisoma encerrado en una envoltura de membrana doble. Esta vacuola autofágica (o autofagosoma) se habría fusionado con un lisosoma y se habría digerido su contenido.

FUENTE: Don Fawcett y Daniel Friend/Photo Researchers Inc.

"posicionan" en la superficie de la célula, donde alertan al sistema inmune de la presencia de un agente extraño.

Los lisosomas también realizan un papel clave en el **recambio** de organelos, es decir, la destrucción regulada de los propios organelos de la célula y su reemplazo. Durante este proceso, que se llama autofagia, un organelo, como la mitocondria que se muestra en la **FIGURA 8-34**, está rodeado por una estructura de doble membrana (o *fagoforo*) para producir una vesícula secuestrante de doble membrana llamada *autofagosoma* (**FIGURA 8-35**). En las células de los mamíferos, se cree que los autofagosomas se forman por primera vez a partir de los sitios de contacto entre el ER y las membranas externas mitocondriales. Una vez formada, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con un lisosoma, generando una estructura llamada *autolisosoma*, en la que tanto la membrana interna del autofagosoma como los contenidos incluidos se degradan. Los productos de estas reacciones de degradación están disponibles para la célula. Se estima que de 1 a 1.5% de las proteínas dentro de una célula hepática sana se degradan por autofagia por hora como parte de un proceso normal de renovación celular. Se cree que el recinto dentro de las vesículas autofagosomales es relativamente selectivo en lugar de un proceso aleatorio. La autofagia tal vez evolucionó en los organismos eucariotas primitivos como respuesta a la privación de nutrientes. Si una población de células, ya sea derivada de levadura, plantas o animales, se coloca bajo condiciones de inanición, se observa un marcado aumento en la autofagia. Bajo estas condiciones, las células adquieren energía para mantener su vida canibalizando sus propios organelos. El mismo proceso autofágico se induce en las células de un embrión de mamífero antes de que se haya implantado en el útero y, por tanto, antes de que pueda aprovechar los nutrientes suministrados a través del torrente sanguíneo de la madre.

Nuestra comprensión de la importancia de la autofagia en los animales ha coincidido con el descubrimiento y el análisis de una serie de genes (conocidos como genes *Atg*) que se requieren para varios pasos en la vía autofágica. La eliminación de algunos de estos genes de autofagia puede tener graves consecuencias para el desarrollo embrionario o la fisiología adulta de organismos modelo, ya sea un gusano o un ratón. Se ha demostrado, por ejemplo, que la autofagia ayuda a proteger un organismo contra amenazas intracelulares que van desde agregados proteicos anormales a bacterias y parásitos invasores. La autofagia también se ha implicado en la prevención de la neurodegeneración. Si la autofagia está bloqueada en una porción particular del cerebro de un animal de laboratorio, esa región del sistema nervioso experimenta una pérdida masiva de células nerviosas. Estos hallazgos revelan la importancia de la autofagia para proteger las células cerebrales

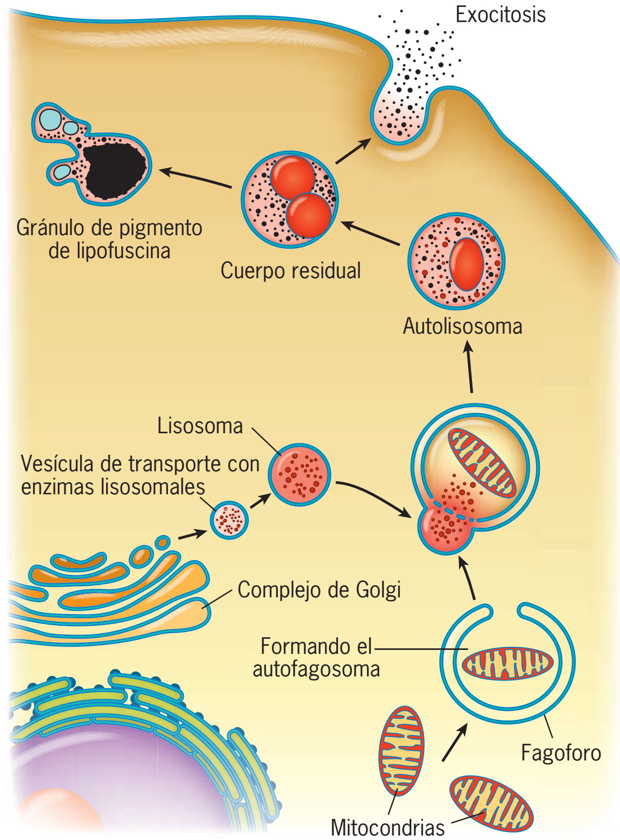



**FIGURA 8-35** Un resumen de la vía autofágica. Los pasos se describen en el texto.

del daño continuo a las proteínas y organelos que experimentan estas células de vida larga. La autofagia incluso puede desempeñar un papel en la prevención de ciertos tipos de cáncer y enlentizan el proceso de envejecimiento del cuerpo.

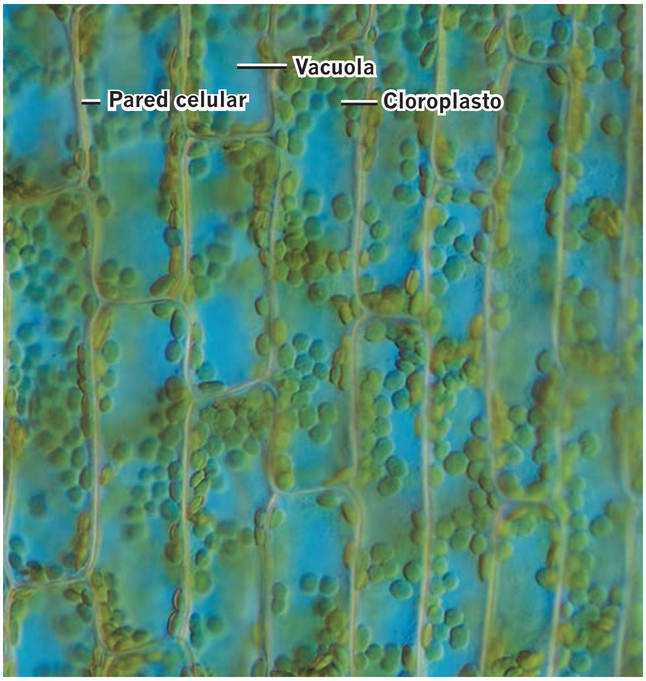
El papel de los lisosomas en la autofagia se resume en la figura 8-35. Una vez que se ha completado el proceso digestivo en el autolisosoma, el organelo se denomina *cuerpo residual*. Dependiendo del tipo de célula, los contenidos del cuerpo residual pueden eliminarse de la célula por exocitosis, o pueden retenerse dentro del citoplasma de manera indefinida como un *gránulo de lipofuscina*. Los gránulos de lipofuscina aumentan en número a medida que un individuo envejece; la acumulación es particularmente evidente en células de larga vida como las neuronas, donde estos gránulos se consideran una característica principal del proceso de envejecimiento. El papel de los lisosomas en diversas enfermedades se discute en la "Perspectiva humana" adjunta.

**REPASO**

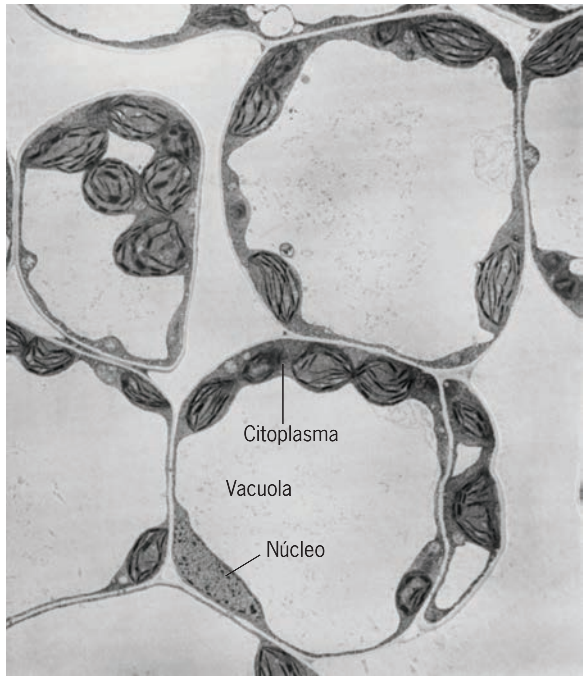
1. Describa tres roles distintos de los lisosomas.
2. Describa los eventos que ocurren durante la destrucción autofágica de una mitocondria.

## 8.16 Vacuolas de células vegetales

Hasta 90% del volumen de muchas células vegetales está ocupado por una sola vacuola central llena de fluido unida a la **vacuola** (**FIGURA 8-36**). Si bien su estructura es simple, las vacuolas vegetales llevan a cabo un amplio espectro de funciones esenciales. Muchos de los solutos y macromoléculas de una célula, incluidos iones, azúcares, aminoácidos, proteínas y polisacáridos, se almacenan temporalmente en la vacuola. Las vacuolas también pue-




a)




b)

**FIGURA 8-36 Vacuolas de células vegetales.** *a*) Cada una de las células cilíndricas de la hoja de la planta acuática *Elodea* contiene una gran vacuola central rodeada por una capa de citoplasma que contiene los cloroplastos que son visibles en la micrografía. *b*) Micrografía electrónica de transmisión de las células del mesófilo de la hoja de espinaca que muestra la gran vacuola central y la capa delgada del citoplasma circundante.

FUENTE: *a*) MI Walker/Photo Researchers, Inc.; *b*) Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.

den almacenar un anfitrión de compuestos tóxicos. Algunos de estos compuestos (como los glucósidos y glucosinolatos que contienen cianuro) forman parte de un arsenal de armas químicas que se liberan cuando la célula es lesionada por un herbívoro u hongo. Otros compuestos tóxicos son simplemente los productos derivados de las reacciones metabólicas; debido a que las plantas carecen del tipo de sistemas excretores que se encuentran en los animales, utilizan sus vacuolas para aislarlas mediante productos del resto de la célula. Algunos de estos compuestos, como la digital, han demostrado tener un importante valor clínico.

La membrana que limita la vacuola, el **tonoplasto**, contiene varios sistemas de transporte activos que bombean iones en el compartimiento vacuolar a una concentración mucho más alta que la del citoplasma o el fluido extracelular. Debido a su alta concentración de iones, el agua ingresa a la vacuola por ósmosis. La presión hidrostática (turgencia) ejercida por la vacuola no solo proporciona soporte mecánico para los tejidos blandos de una planta (figura 4-36), también estira la pared celular durante el crecimiento celular.

Las vacuolas de las plantas también son sitios de digestión intracelular, a diferencia de los lisosomas, que están ausentes en las plantas. De hecho, las vacuolas vegetales tienen algunas de las mismas hidrolasas ácidas que se encuentran en los lisosomas. El pH de la vacuola se mantiene a un valor bajo mediante una tipo-V $H^+$-ATPasa dentro del tonoplasto que bombea protones al fluido vacuolar. Al igual que las proteínas del lisosoma, muchas de las proteínas de una vacuola vegetal se sintetizan en los ribosomas del RER unidos a la membrana, se transportan a través del complejo de Golgi y se clasifican en la cara *trans* del Golgi antes de dirigirse a la vacuola.

### REPASO

1. Describa tres roles distintos de las vacuolas vegetales.
2. ¿De qué manera es una vacuola vegetal similar a un lisosoma? ¿De qué manera es diferente?

## 8.17 Endocitosis

Hemos descrito en detalle cómo una célula transporta materiales desde el RER y Golgi hasta la membrana plasmática y el espacio extracelular. Ahora podemos pasar al movimiento de materiales en la dirección opuesta. Consideramos en el capítulo 4 cómo los solutos de bajo peso molécular pasan a través de la membrana plasmática. Pero, ¿cómo pueden las células absorber materiales que son demasiado grandes para penetrar esta membrana, independientemente de sus propiedades de permeabilidad? ¿Y cómo se reciclan las proteínas que residen en la membrana plasmática a los compartimientos internos de la célula? Ambos requisitos se cumplen mediante la vía endocítica, en la que los segmentos de la membrana plasmática se invaginan para formar vesículas citoplásmicas que se transportan al interior de la célula. Consideraremos dos procesos básicos en esta sección del capítulo: endocitosis y fagocitosis, que ocurren por diferentes mecanismos. La **endocitosis** es un proceso principalmente por el cual la célula internaliza receptores de superficie celular y ligandos extracelulares unidos. La **fagocitosis** describe la absorción de material particulado.

La endocitosis se puede dividir ampliamente en dos categorías: endocitosis en fase masiva y endocitosis mediada por receptor. La *endocitosis a gran escala* (también conocida como *pinocitosis*) es la captación no específica de fluidos extracelulares. Cualquier molécula, grande o pequeña, que esté presente en el fluido encerrado también ingresa a la célula. La endocitosis a gran escala puede visualizarse añadiendo una sustancia al medio de cultivo, como el colorante lucifer amarillo o la enzima peroxidasa de rábano picante, que las células absorben inespecíficamente. La endocitosis a gran escala también elimina partes de la membrana plasmática y puede funcionar principalmente en el reciclado de la membrana entre la superficie celular y los compartimientos interiores. Por el contrario, la **endocitosis mediada por receptor** (**RME**, *receptor-mediated endocytosis*), que también se denomina endocitosis mediada por clatrina, provoca la captación de macromoléculas extracelulares específicas (ligandos) des-

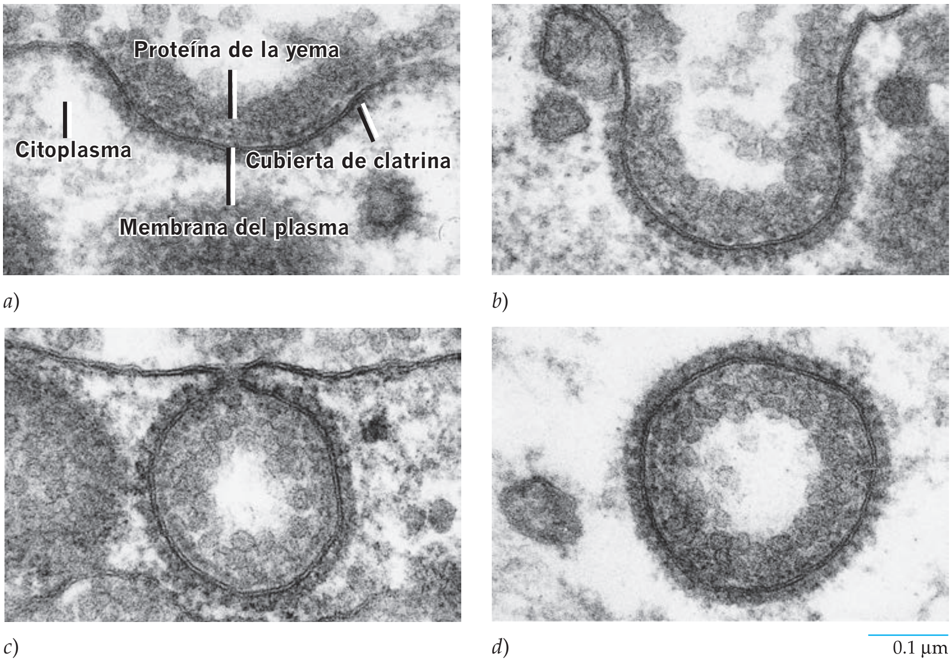



**FIGURA 8-37 Endocitosis mediada por receptor.** Esta secuencia de micrografías muestra los pasos en la absorción de las lipoproteínas de la yema por el ovocito de la gallina. *a*) Las proteínas que deben tomarse en la célula se concentran en la superficie extracelular de una región indentada de la membrana plasmática, formando un foso revestido. La superficie citosólica de la membrana plasmática del hoyo recubierto está cubierta con un material de aspecto espinoso y electrodenso que contiene la proteína clatrina. *b*) El pozo recubierto se ha hundido hacia adentro para formar un brote recubierto. *c*) La membrana plasmática está a punto de pellizcarse como una vesícula que contiene la proteína de la yema en su superficie luminal (previamente extracelular) y clatrina en su superficie citosólica. *d*) Una vesícula recubierta que ya no está unida a la membrana plasmática. El siguiente paso en el proceso es la liberación de la capa de clatrina.

FUENTE: *a-d*) de M. M. Perry y A. B. Gilbert. *J Cell Science* 1979;39:257, con permiso de The Company of Biologists, Ltd. http://jcs.biologists.org/content/39/1/257.completo.pdf+html?sid=2493468d-1f02-467a-a192-c2c876bd98b9

pués de su unión a los receptores en la superficie externa de la membrana plasmática.[5]

## Endocitosis mediada por receptores y el papel de los hoyos recubiertos

La endocitosis mediada por receptor proporciona un medio para la captación selectiva y eficiente de macromoléculas que pueden estar presentes a concentraciones relativamente bajas en el fluido extracelular. Las células tienen receptores para la captación de muchos tipos diferentes de ligandos, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, enzimas y proteínas transmitidas por la sangre que transportan ciertos nutrientes. Las sustancias que entran en una célula mediante clatrina-mediada RME se unen a receptores que se acumulan en dominios especializados de la membrana plasmática, conocidos como hoyos recubiertos. Los receptores se concentran en **fosos recubiertos** a 10-20 veces su nivel en el resto de la membrana plasmática. Los hoyos recubiertos (**FIGURA 8-37*a***) se reconocen en micrografías electrónicas como sitios donde la superficie está indentada y la membrana plasmática está cubierta en su cara citoplásmica por una capa erizada electrodensa que contiene clatrina. Los hoyos recubiertos se invaginan en el citoplasma (figura 8-37*b*) y luego se capturan sin la membrana plasmática para formar vesículas recubiertas (figura 8-37*c, d*). Para comprender el mecanismo de la formación de vesículas recubiertas, debemos examinar la estructura molecular del revestimiento de clatrina.

La **FIGURA 8-38** muestra un foso recubierto visto desde las superficies extracelular y citoplásmica de las membranas plasmáticas de las células que se habían dedicado a la endocitosis media-

[5] A lo largo de los años, se han descrito varios mecanismos distintos de endocitosis mediada por receptor, aunque algunos de estos mecanismos propuestos siguen siendo controvertidos. Para nuestro propósito, discutiremos solo un mecanismo de endocitosis, el que se logra mediante capas que contienen clatrina, el mismo tipo de capa de proteína que se discute en la sección 8.11 en relación con las vesículas formadas en el TGN. (Las discusiones sobre la endocitosis independiente de clatrina se pueden encontrar en *Ann Rev Biochem* 2009;78:857; *J Cell Sci* 2009;122:1713 y *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:519 y 2011;23:413).

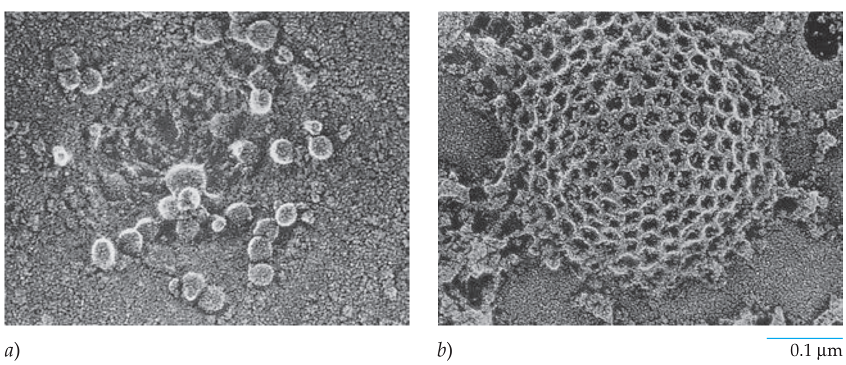



**FIGURA 8-38 Pozos recubiertos.** *a*) Micrografía electrónica de una réplica formada en la superficie extracelular de un fibroblasto entero liofilizado que se había incubado con colesterol LDL. Las partículas de colesterol LDL son visibles como estructuras esféricas localizadas en la *superficie extracelular* del pozo recubierto. *b*) Micrografía electrónica de una réplica de la superficie citosólica de un brote recubierto que muestra la membrana plasmática invaginada rodeada por una red de clatrina que ha asumido una forma hemisférica.

FUENTE: *a-b*) Tomada de John Heuser y Louise Evans. *J Cell Biol* 1980;84:568; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

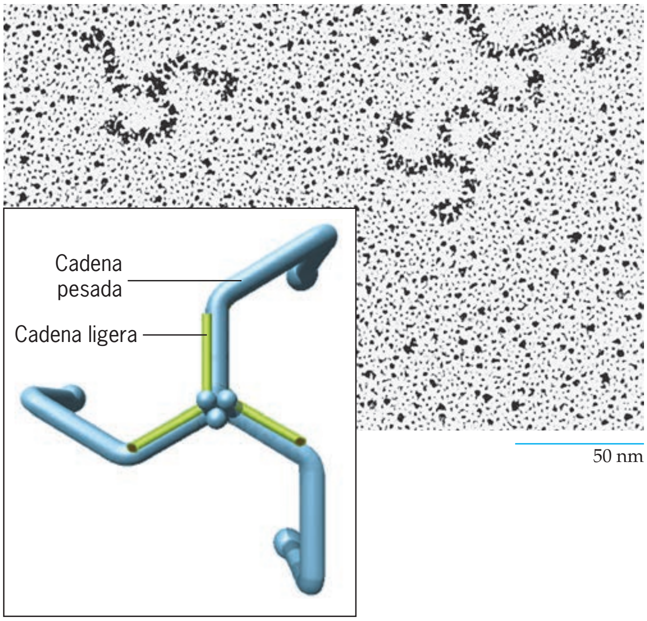



**FIGURA 8-39 Triskeliones de clatrina.** Micrografía electrónica de una preparación sombreada por metales de triskeliones de clatrina. El recuadro muestra que el triskelion se compone de tres cadenas pesadas. La porción interna de cada cadena pesada está vinculada a una cadena ligera más pequeña.

FUENTE: Reproducida con permiso de Macmillan Publishers Ltd: Ernst Ungewickell y Daniel Branton. *Nature* 1981;289:421; © 1981.

da por receptor. Cuando se ve desde su superficie citoplásmica (figura 8-38*b*), la capa espinosa aparece como una red de polígonos (hexágonos y pentágonos) que se asemeja a una pelota de fútbol. La construcción geométrica de la capa se deriva de la estructura de sus bloques de construcción de clatrina. Cada molécula de clatrina consiste en tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras, unidas en el centro para formar un conjunto de tres patas llamado *triskelion* (**FIGURA 8-39**). La disposición solapante de los triskeliones dentro del andamio de clatrina de una vesícula recubierta se muestra en la figura 8-40. Cada pata de un triskelion de clatrina se extiende hacia afuera a lo largo de dos bordes de un polígono. Las moléculas de clatrina se superponen de tal manera que cada vértice de un polígono contiene un centro de uno de los componentes triskeliones (figura 8-40*c*).

Al igual que las vesículas recubiertas con clatrina que brotan de la TGN (figura 8-29), las vesículas recubiertas que se forman durante la endocitosis también contienen una capa de adaptadores situada entre la red de clatrina y la superficie de la vesícula que mira al citosol. El adaptador mejor estudiado que opera en conexión con la endocitosis mediada por clatrina es AP2. A diferencia de los adaptadores GGA utilizados en la TGN, que consisten en una única subunidad con varios dominios (figura 8-30), los adaptadores AP2 que se incorporan a las vesículas que brotan de la membrana plasmática contienen múltiples subunidades con funciones diferentes (figura 8-40). La subunidad μ de los adaptadores AP2 activa las colas citoplásmicas de los receptores específicos de la membrana plasmática, lo que conduce a la concentración de estos receptores seleccionados y sus moléculas de carga unidas en la vesícula emergente recubierta (discutidas más adelante en "Vía experimental", sección 8.18). Por el contrario, la subunidad betaadaptina de los adaptadores AP2 se une y recluta las moléculas de clatrina de la red superpuesta. La figura 8-27*b*) ilustra algunas de las diferencias estructurales marcadas y las similitudes entre las capas de COPII-, COPI- y las vesículas recubiertas de clatrina. Las tres capas contienen dos capas distintas: un andamio geométrico externo y una capa interna de proteínas adaptadoras (o como adaptador). La estructura de los andamios

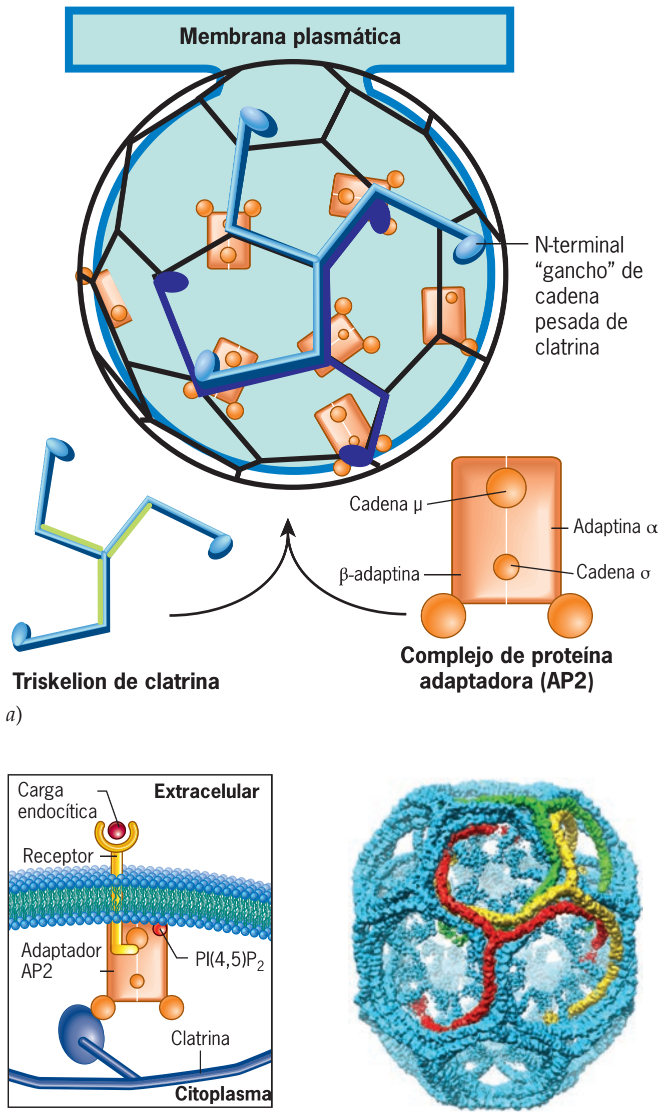



**FIGURA 8-40 Organización molecular de una vesícula recubierta.** *a*) Dibujo esquemático de la superficie de una vesícula recubierta que muestra la disposición de triskeliones y adaptadores en la capa exterior de clatrina. Los lados de los polígonos están formados por partes de las patas de los triskeliones superpuestos. El extremo N de cada cadena pesada de clatrina forma un "gancho" que se proyecta hacia la superficie de la membrana donde se acopla un adaptador. Cada adaptador, que consta de cuatro subunidades polipeptídicas diferentes, puede unir una gran variedad de proteínas accesorias que no se muestran en esta ilustración. Tanto los ganchos como los adaptadores están situados en los vértices de los poliedros. (*Nota:* No todos los triskeliones del enrejado se muestran en esta figura; si lo fueran, cada vértice tendría un cubo de clatrina, un gancho y un adaptador asociado). *b*) Dibujo esquemático de una sección transversal a través de la superficie de una vesícula recubierta que muestra las interacciones de los complejos del adaptador AP2 con la capa de clatrina y los receptores de membrana. El reclutamiento de adaptadores AP2 a la membrana plasmática se ve facilitado por la presencia de moléculas PI $(4,5)P_2$ en la hoja interna (citosólico) de la membrana, como se muestra en la figura 8-42. Cada receptor está unido a un ligando que se está internalizando. c) Reconstrucción de una jaula de clatrina que contiene 36 triskeliones que muestra la disposición superpuesta de varias de estas moléculas triméricas (mostradas en diferentes colores).

FUENTE: *a*) Richardson Charles C, Abelson John N, Raetz Christian RH. *Repaso anual de bioquímica* 1996; volumen 65, copyright 1997. Reproducida con permiso de Annual Reviews, Inc. En el libro de texto de formato a través del centro de autorización de derechos de autor; *b-c*) Tomada de Alexander Fotin, *et al*. *Nature* 2004;432:574, cortesía de Stephen C. Harrison; © 2004. Reproducida con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

exteriores, sin embargo, son muy diferentes; las subunidades del enrejado de clatrina (tres complejos de clatrina) se superponen ampliamente, mientras que las del enrejado de COPII (complejos Sec13-Sec31 tipo barra) no se superponen en absoluto. Además, cada vértice de una capa de COPII está formado por cuatro bordes en lugar de tres como en una capa de clatrina (y como se sospecha en la capa de COPI).

La estructura representada en la figura 8-40 es una versión muy simplificada de una vesícula recubierta real, que puede contener más de dos docenas de proteínas accesorias diferentes que forman una red dinámica de moléculas que interactúan. Estas proteínas tienen un papel en el reclutamiento de carga, el ensamblaje de la capa, la flexión e invaginación de la membrana, la interacción con los componentes del citoesqueleto, la liberación de vesículas y la eliminación de la membrana no cubierta. Una de las proteínas accesorias mejor estudiadas es la dinamina.

La *dinamina* es una proteína grande unida a GTP que se requiere para la fisión de la vesícula de la membrana sobre la que se forma. La dinamina se monta de forma automática en un collar helicoidal alrededor del cuello de un hoyo recubierto invaginado (**FIGURA 8-41**), justo antes de que se desprenda de la membrana. En el modelo representado en la figura 8-41*a*), pasos 3-4, la hidrólisis del GTP unido por las moléculas de dinamina polimerizadas induce un movimiento en la hélice de dinamina que corta la vesícula recubierta de la membrana plasmática. De acuerdo con este mecanismo, la dinamina actúa como una enzima capaz de utilizar la energía química del GTP para generar fuerzas mecánicas. La disociación de la capa de clatrina de la vesícula requiere la ayuda de una proteína adicional, la ATPasa Hsc70, que se recluta a la capa de clatrina por un cofactor, auxilina.

## El papel de los fosfoinosítidos en la regulación de las vesículas recubiertas

Aunque esta discusión enfatiza las moléculas de proteína del revestimiento y la vesícula, los fosfolípidos de la membrana de la vesícula también realizan un papel importante. Como se discutió en el capítulo 15, los grupos de fosfato se pueden agregar a diferentes posiciones del anillo de azúcar del fosfolípido fosfatidilinositol (PI, *phosphatidylinositol*), convirtiéndolos en fosfoinosítidos (véase figura 15-10). Se identifican siete fosfoinosítidos distintos: PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)$P_2$, PI(4,5)$P_2$, PI(3,5)$P_2$ y PI(3,4,5)$P_3$. Los anillos fosforilados de estos fosfoinosítidos residen en la superficie de la membrana donde pueden ser reconocidos y unidos por proteínas particulares. Diferentes fosfo-inosítidos se concentran en diferentes compartimientos de membrana, lo que ayuda a dar a cada compartimiento una "identidad de superficie" única. La valva interna de la membrana plasmática, por ejemplo, tiende a contener niveles elevados de PI (4.5) $P_2$, que desempeña un papel importante en el reclutamiento de proteínas involucradas en la endocitosis mediada por clatrina, como dinamina y AP2 (véase figura 8-40*b*). Un fosfoinosítido no solo ayuda a reclutar proteínas específicas, sino que también puede inducir cambios conformacionales en una proteína unida que facilitan un proceso molecular. El adaptador de clatrina AP2, por ejemplo, normalmente existe en el citosol en una conformación bloqueada. La unión del complejo AP2 a los sitios PI(4-5)$P_2$ de la membrana plasmática induce un cambio conformacional importante en AP2 que abre un sitio de unión de carga dentro del adaptador, lo que le permite interactuar con las colas citoplásmicas de receptores de membrana específicos. En la **FIGURA 8-42** se muestra un modelo estructural que representa esta serie de eventos. Los niveles de fosfoinosítidos también pueden realizar un papel en el desmontaje del enrejado de clatrina. Se ha propuesto que la actividad de la fosfatasa en la vesícula recién desarrollada hace que la membrana de la vesícula se vuelva rica en PI(4)P en relación con PI(4,5)$P_2$, que se cree que produce un aumento en el reclutamiento de auxilinas en la vesícula lo que lleva al desmontaje rápido de la capa de clatrina.

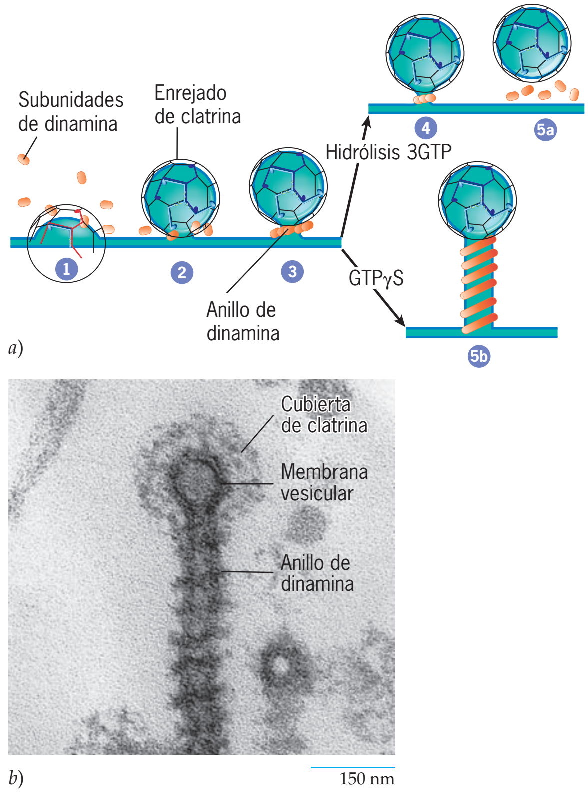



**FIGURA 8-41 El papel de la dinamina en la formación de vesículas recubiertas de clatrina.** *a*) La red cristalina de clatrina del pozo recubierto (paso 1) experimenta reordenamiento para formar una vesícula invaginada conectada a la membrana plasmática que lo recubre mediante un pedúnculo (paso 2). En este punto, las subunidades de dinamina, que se concentran en la región, se someten a polimerización para formar un anillo alrededor del pedúnculo (paso 3). Los cambios en la conformación del anillo, que se cree que son inducidos por la hidrólisis de GTP (paso 4), conducen a la fisión de la vesícula recubierta de la membrana plasmática y al desmontaje del anillo de dinamina (paso 5a). Si la gemación de vesículas ocurre en presencia de GTPγS, un análogo no hidrolizable de GTP, la polimerización de dinamina continúa más allá de la formación de un collar simple, produciendo un túbulo estrecho construido a partir de varias vueltas de la hélice de dinamina (paso 5b). Los modelos estructurales de acción de la dinamina se pueden encontrar en *Nature* 2011;477:556,561. b) Micrografía electrónica que muestra una vesícula recubierta que se forma en presencia de GTPγS, que corresponde a la etapa representada en el paso 5b de la parte a.

FUENTE: *a*) Reimpreso de P. De Camilli, *et al. Actual Opin Neuro-Biol* 1995;Vol 5:562, con permiso de Elsevier. *b*) de Kohji Takei, *et al. Nature* 1995;Vol 374, Cubierta 3/9/95; © 1995, reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

Una especie de lípidos como PI(4,5)$P_2$ puede tener un papel regulador dinámico porque puede ser rápidamente formado y destruido por enzimas que están localizadas en lugares y tiempos particulares dentro de la célula. En el ejemplo de la endocitosis, el PI(4,5)$P_2$ desaparece de un sitio de endocitosis aproximadamente al momento en que la vesícula recubierta se separa de la membrana plasmática. Otros PI que se cree que sirven como "puntos de referencia" dentro de las vías secretorias/endocíticas incluyen PI(3)P localizado en los endosomas tempranos y en las vesículas intraluminales de los endosomas tardíos; PI(4)P localizado en la TGN, gránulos secretores y vesículas sinápticas, y PI(3,5)$P_2$ localizado en la membrana límite del endosoma tardío.

**REPASO**

1. Describa la estructura molecular de la clatrina y la relación entre su estructura y función.

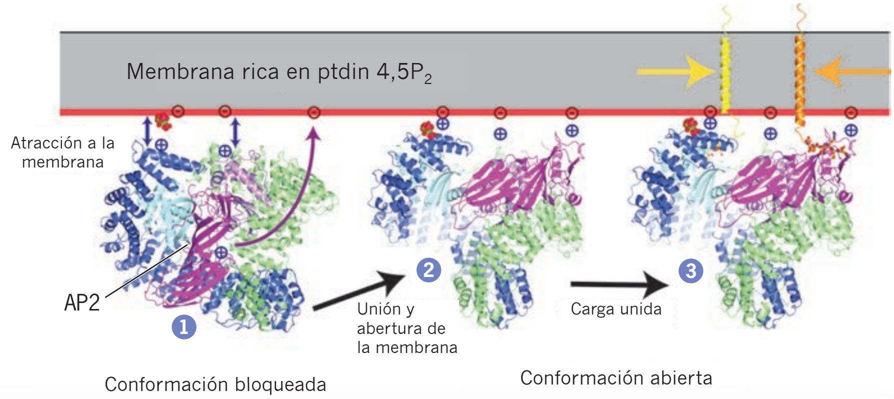



**FIGURA 8-42.** Un modelo estructural que representa los cambios en la conformación de la proteína que ocurren cuando AP2 se une a la membrana plasmática. La unión del adaptador AP2 está mediada por su interacción con las moléculas de PI(4,5)$P_2$ en la valva interna de la membrana plasmática (paso 1). La unión del adaptador a la membrana induce un gran cambio conformacional en el adaptador (paso 2) que facilita su interacción con motivos específicos en las colas citoplásmicas de ciertos receptores de membrana (mostrados en amarillo y naranja) (paso 3).

FUENTE: De LP Jackson, *et al*. Cortesía de David J. Owen. *Cell* 2010;141;1228, fig. 7. © 2010, reimpreso con autorización de Elsevier.

# 8.18 VÍAS EXPERIMENTALES

## Endocitosis mediada por receptor

El desarrollo embrionario comienza con la fusión de una esperma minúscula y un huevo mucho más grande. Los huevos se desarrollan a partir de ovocitos, que acumulan yema que se ha sintetizado en otras partes del cuerpo de la hembra. ¿Cómo pueden las proteínas de la yema de alto peso molecular entrar al ovocito? En 1964, Thomas Roth y Keith Porter de la Universidad de Harvard informaron sobre el mecanismo por el cual las proteínas de la yema se pueden tomar en los ovocitos de los mosquitos.[1] Notaron que durante las etapas de crecimiento rápido de ovocitos, hubo un aumento dramático en el número de depresiones en forma de hoyo observadas en la superficie del ovocito. Las fosas, que estaban formadas por invaginaciones de la membrana plasmática, estaban cubiertas en su superficie interna por un pelaje erizado. En una propuesta de visión de futuro, Roth y Porter postularon que las proteínas de la yema se adsorbieron específicamente en la superficie externa de la membrana de las fosas recubiertas, que luego invaginarían como vesículas recubiertas. Las vesículas recubiertas perderían sus capas espinosas y se fusionarían entre sí para producir los grandes cuerpos de yema unidos a la membrana, característicos del ovocito maduro.

La primera idea de la estructura de las vesículas recubiertas se obtuvo en 1969 por Toku Kanaseki y Ken Kadota de la Universidad de Osaka.[2] El examen por microscopio electrónico de una fracción de vesícula bruta aislada de cerebros de cobaya mostró que las vesículas recubiertas estaban cubiertas por una cestería poligonal (**FIGURA 1**). Estos investigadores sugirieron que los revestimientos eran un aparato para controlar la invaginación de la membrana plasmática durante la formación de vesículas.

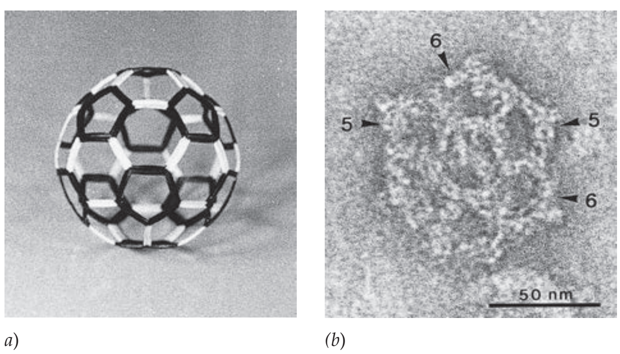



**FIGURA 1** *a*) Modelo hecho a mano de una "cesta vacía" que formaría la red de superficie de una vesícula recubierta. *b*) Una micrografía electrónica de alta potencia de una canasta proteínica vacía. Los números 5 y 6 se refieren a elementos pentagonales y hexagonales del enrejado, respectivamente.

FUENTE: de Toku Kanaseki y Ken Kadota. *J Cell Biol* 1969;42: 216; reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

Los primeros estudios de la naturaleza bioquímica del recubrimiento de vesículas fueron publicados en 1975 por Barbara Pearse del Medical Research Council en Cambridge, Inglaterra.[3] Pearse desarrolló un procedimiento en el que las vesículas de membrana de cerebros de cerdo se centrifugaron a través de una sucesión de gradientes de densidad de sacarosa hasta que se obtuvo una fracción purificada de vesículas recubiertas. La proteína de las vesículas recubiertas se solubilizó y se fraccionó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 18.7). Los resultados indicaron que la cubierta contenía una especie de proteína predominante que tenía una masa molecular de aproximadamente 180 000 daltons. Pearse llamó a la proteína clatrina.[4]

Como se estaba llevando a cabo el estudio antes descrito, en 1973 se inició una línea de investigación aparentemente independiente en los laboratorios de Michael Brown y Joseph Goldstein de la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas en Dallas. Brown y Goldstein se interesaron en la condición hereditaria de la *hipercolesterolemia familiar* (FH, *familial hypercholesterolemia*). Las personas que eran homocigóticas para el gen defectuoso (el alelo *FH*) tenían niveles muy elevados de colesterol sérico (800 mg/dL frente a 200 mg/dL para una persona normal), invariablemente desarrollaron arterias severamente bloqueadas (ateroscleróticas) y por lo general fallecieron a causa de ataque cardiaco antes de los 20 años. En ese momento, se sabía muy poco acerca de los defectos fisiológicos o bioquímicos fundamentales en este trastorno.

Brown y Goldstein comenzaron sus estudios de FH examinando el metabolismo del colesterol en fibroblastos cultivados derivados de la piel de individuos normales y afectados por FH. Descubrieron que la enzima controladora de la velocidad en la biosíntesis del colesterol, HMG CoA reductasa, podría ser inhibida en los fibroblastos normales por lipoproteínas que contienen colesterol (como LDL) colocadas en el medio (**FIGURA 2**).[5] Por tanto, la adición de LDL al medio de cultivo en el que estaban creciendo los fibroblastos normales condujo a un nivel disminuido de actividad de HMG CoA reductasa y una disminución correspondiente en la síntesis de colesterol por los fibroblastos. Cuando se midieron los niveles de HMG CoA reductasa en los fibroblastos derivados de FH, se descubrió que eran de 40 a 60 veces mayores que los de los fibroblastos normales.[6] Además, la actividad enzimática en los fibroblastos FH no se vio afectada por la presencia de LDL en el medio (**FIGURA 3**).

¿Cómo podrían las lipoproteínas en el medio afectar la actividad de una enzima en el citoplasma de las células cultivadas? Para responder a esta pregunta, Brown y Goldstein iniciaron es-

(*continúa*)

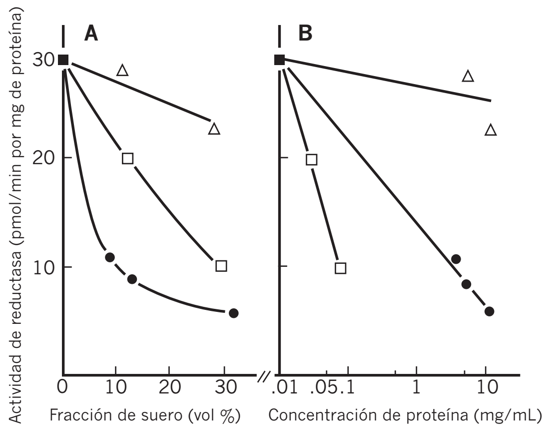



**FIGURA 2** La actividad HMG CoA reductasa en fibroblastos normales se midió después de la adición de la fracción de lipoproteína de suero de ternera (cuadrados vacíos), suero de ternero no fraccionado (círculos cerrados) o fracción no lipoproteica de suero de ternera (triángulos vacíos). Es evidente que las lipoproteínas reducen en gran medida la actividad de la enzima, mientras que las no lipoproteínas tienen poco efecto.

FUENTE: de M. S. Brown, *et al. Proc. Nat'l Acad Sci USA* 1973;70:2166.

tudios sobre la interacción entre las células y las lipoproteínas. Agregaron LDL marcadas radiactivamente a placas de cultivo que contenían una capa única de fibroblastos derivados de sujetos humanos afectados por FH o normales.[7] Los fibroblastos normales unieron las moléculas de LDL marcadas con alta afinidad y especificidad, pero las células mutantes mostraron prácticamente ninguna capacidad para unir estas moléculas de lipoproteína (**FIGURA 4**). Estos resultados indicaron que las células normales tienen un receptor altamente específico para LDL y que este receptor era defectuoso o faltaba en las células de pacientes con HF.

Para visualizar el proceso de unión e internalización del receptor, Brown y Goldstein se asociaron con Richard Anderson, que había estado estudiando la estructura celular con el microscopio electrónico. El grupo incubó fibroblastos de sujetos normales y con HF con LDL que se habían unido covalentemente a la proteína ferritina que contiene hierro. Debido a los átomos de hierro, las moléculas de ferritina pueden dispersar un haz de electrones y, por tanto, pueden visualizarse en el microscopio electrónico. Cuando los fibroblastos normales se incubaron con LDL-ferritina a 4 °C, una temperatura a la que los ligandos se pueden unir a la superficie de la célula pero no se pueden internalizar, se observó que las partículas de LDL-ferritina se unían a la superficie de la célula. Un examen detallado reveló que las partículas de LDL no estaban dispersas al azar sobre la superficie de la célula, sino que estaban localizadas en segmentos cortos de la membrana plasmática donde la membrana estaba indentada y recubierta por un material "difuso" (**FIGURA 5**).[8] Estos segmentos de la membrana eran similares a los pozos revestidos originalmente descritos por Roth y Porter y desde entonces se han visto en una variedad de tipos de células. Aunque se encontró que las células de pacientes con FH tenían una cantidad similar de hoyos recubiertos en su superficie, no se unía la ferritina LDL a estas células mutantes. Los resultados respaldaron la propuesta de que el alelo FH mutante codificaba un receptor que no podía unir LDL. Los estudios microscópicos de electrones posteriores sobre la internalización de LDL-ferritina revelaron la vía endocítica mediante la cual estas partículas de lipoproteína se internalizaron, como se describe en el capítulo.[9]

Sobre la base de estos resultados, el grupo postuló que la internalización rápida del LDL unido al receptor depende estric-

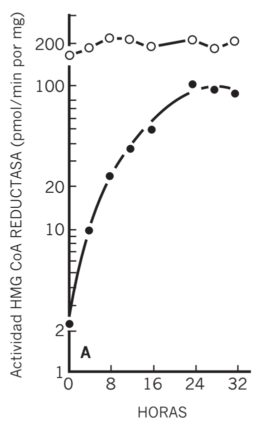



**FIGURA 3** Células de fibroblastos de un sujeto de control (círculos cerrados) o un paciente con FH homocigótica (círculos vacíos) se cultivaron en placas que contenían suero de ternera fetal. El día 6 (que corresponde a 0 horas en el gráfico), el medio se reemplazó por medio nuevo que contenía plasma humano deficiente en lipoproteínas. En el momento indicado, se prepararon extractos y se midió la actividad HMG CoA reductasa. Si observamos las células de control, es evidente que al comienzo del periodo de monitoreo, las células tienen muy poca actividad enzimática porque el medio contenía suficientes lipoproteínas que contienen colesterol que las células no necesitaban para sintetizar las propias. Una vez que se cambió el medio al plasma deficiente en lipoproteínas, las células ya no pudieron usar el colesterol del medio y por tanto aumentaron la cantidad de enzima dentro de la célula. Por el contrario, las células de los pacientes con FH no mostraron respuesta a la presencia o ausencia de lipoproteínas en el medio.

FUENTE: De J. L. Goldstein y M. S. Brown. *Proc Nat›l. Acad Sci USA* 1973;70:2805.

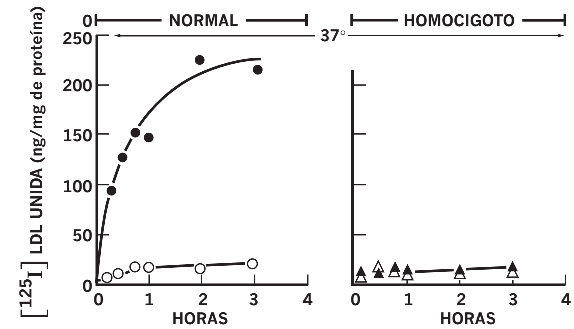



**FIGURA 4** Evolución temporal de la unión de LDL marcada con [$^{125}$I] radiactivo a células de un sujeto normal (círculos) y un homocigoto con FH (triángulos) a 378°C. Las células se incubaron en un tampón que contenía 5 mg/mL de [$^{125}$I] LDL en presencia (círculos y triángulos abiertos) y ausencia (círculos y triángulos cerrados) de 250 mg/mL de LDL no radiactiva. Es evidente que, en ausencia de LDL no radiactiva agregada, las células normales se unen a cantidades significativas de la LDL marcada, mientras que las células de los pacientes con FH no lo hacen. La unión de LDL marcada se reduce en gran medida en presencia de LDL no radiactiva porque las lipoproteínas no etiquetadas compiten con las marcadas por sitios de unión. Por tanto, la unión de la lipoproteína a las células es específica (es decir, no es el resultado de un evento de unión no específico).

FUENTE: de M. S. Brown y J. L. Goldstein. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1974;71:790.

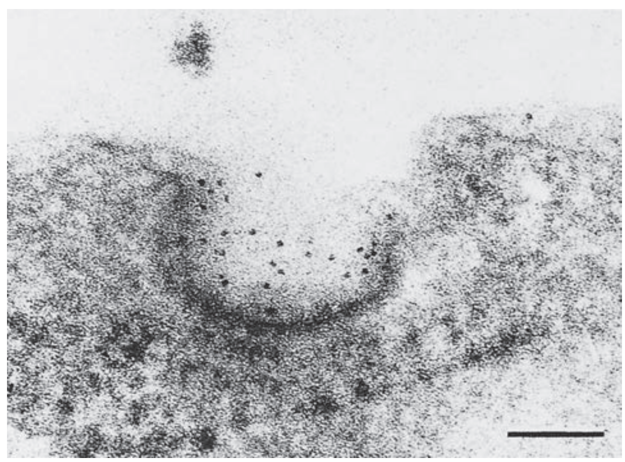


**FIGURA 5** Micrografía electrónica que muestra la unión de LDL a un hoyo recubierto de un fibroblasto humano. La LDL se hace visible al conjugar las partículas a ferritina que contiene hierro electrodenso. Bar: 100 nm.

FUENTE: Tomada de R. G. W. Anderson, M. S. Brown y J. L. Goldstein. *Cell* 1977;10:356; Reimpresa con permiso de Elsevier.

tamente de la localización de los receptores de LDL en los pozos recubiertos. De este postulado se deduce que, si un receptor de LDL no llegara a localizarse dentro de un hoyo revestido, sería incapaz de liberar su ligando unido a los lisosomas celulares y, por tanto, no podría afectar la biosíntesis del colesterol dentro de la célula. Aproximadamente en este momento, se descubrió un receptor de LDL con un tipo diferente de mutación. Los receptores de LDL que tienen este nuevo defecto (conocido como la mutación JD después del paciente en el que ocurrió) unieron cantidades normales de LDL marcadas radiactivamente, pero la lipoproteína unida al receptor no se internalizó y, por tanto, no se administró a los lisosomas citoplásmicos para su procesamiento.[10] Anderson y colaboradores postularon que el receptor de LDL era una proteína transmembrana que normalmente se localizaba en fosas recubiertas debido a que su dominio citoplasmático estaba específicamente unido a un componente de los pozos recubiertos, tal vez clatrina (pero más tarde identificada como una subunidad probable de un Adaptador AP, como se explica a continuación). Debido a un defecto en su dominio citoplasmático, el receptor mutante J. D. no pudo localizarse en los pozos recubiertos de una célula. Las personas con esta mutación exhiben el mismo fenotipo que los pacientes cuyos receptores no pueden unirse a LDL. Algunos de los antecedentes históricos del trabajo que acabamos de describir se pueden encontrar en referencia.[11]

Estudios posteriores determinaron que el receptor de LDL normal es una glucoproteína transmembrana de 839 aminoácidos, con los 50 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína que se extiende hacia adentro desde la membrana como un dominio citoplásmico. El análisis del receptor mutante J. D. reveló que la proteína contenía una única sustitución de aminoácido: un residuo de tirosina situado normalmente en la posición 807 se reemplazó por una cisteína.[12] Esta única alteración en la secuencia de aminoácidos anuló la capacidad de la proteína para concentrarse en las fosas recubiertas.

En los años siguientes, la atención se centró en las secuencias de aminoácido de las colas citoplásmicas de otros receptores que se localizaron en fosas recubiertas. Los estudios sobre una amplia gama de receptores de membrana revelaron varias señales de internalización que fueron compartidas por numerosas proteínas de membrana. Las dos señales más comunes son 1) una señal YXX$\phi$ (como en el receptor de transferrina) donde Y es tirosina, X puede ser cualquier aminoácido, y $\phi$ es un aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica voluminosa, y 2) un señal de dileucina ácida que contiene dos residuos de leucina adyacentes (como en la proteína CD4 que sirve como receptor del HIV en la superficie de los linfocitos T). La secuencia YXX$\phi$ del receptor se une a la subunidad $\mu$ de los adaptadores AP2, y el resto de dileucina se une a la subunidad $\delta$ de los adaptadores AP2 (figura 8-40*b*).[13] Estudios de rayos X cristalográficos revelaron la naturaleza de las interacciones entre el adaptador y estas señales de internalización. Se incluyen dentro de la subunidad $\mu$ dos bolsillos hidrófobos, uno que se une al residuo de tirosina y el otro que se une a la cadena lateral hidrófoba voluminosa de la señal de internalización YXX $\phi$.[14] De forma similar, la señal de dileucina se une a un bolsillo hidrofóbico en la subunidad $\delta$.[15] Mientras tanto, el complejo adaptador AP2 se une al recubrimiento de clatrina por medio de su betasubunidad (figura 8-40 *b*). Como resultado de estos diversos contactos intermoleculares, el complejo adaptador y el receptor quedan atrapados en fosas recubiertas antes de la endocitosis.[Revisado en 16-18]

Durante la última década, se han seguido muchas líneas diferentes de investigación de la endocitosis mediada por clatrina. Uno de los enfoques experimentales más gratificantes ha sido etiquetar dos o más componentes de la maquinaria endocítica con diferentes marcadores fluorescentes y seguir sus movimientos a lo largo del tiempo dentro de una célula viva. Utilizando este enfoque, los investigadores observaron cómo la dinamina, los adaptadores AP2 o varios tipos de receptores de carga se unen a fosas recubiertas de clatrina y se envuelven en una vesícula recubierta de clatrina, que luego brota hacia el citoplasma y desaparece. La **FIGURA 6** representa un ejemplo de este tipo de experimento.[19] Las micrografías de fluorescencia muestran la superficie de una célula epitelial de mamífero cultivada que expresa una cadena ligera de clatrina que está fusionada a una variante de la proteína fluorescente verde. Los parches verdes, en su mayor parte, representan hoyos recubiertos de clatrina situados en la superficie de la célula. Los puntos de tinción roja son partículas de LDL marcadas fluorescentemente de forma individual que se añadieron al medio en el que crecían las células. La serie de imágenes ilustran un hoyo particular revestido de clatrina (indicado por la flecha verde en el segundo marco señalado con 23) que ha capturado una partícula LDL particular (indicada por las flechas rojas en estos mismos cuadros iniciales). Una vez que la partícula de LDL se ha unido a un receptor de LDL en el hoyo recubierto, la superposición de los dos colorantes fluorescentes produce una mancha amarillo-naranja (indicada por las flechas amarillas en los marcos señalados como $T_2$ y $T_3$). Los marcos restantes (señalados $T_4$) muestran la vesícula no recubierta que contiene la partícula LDL fluorescente roja que se mueve hacia el citoplasma adyacente.

Los recientes avances en la microscopía de fluorescencia han permitido a los investigadores cuantificar el número exacto de moléculas fluorescentes en la membrana de una célula viva con una alta resolución temporal, proporcionando una comprensión detallada de los eventos iniciales que conducen a la endocitosis mediada por clatrina. Algunos de estos estudios aprovechan una técnica conocida como microscopía de fluorescencia de reflujo interno total (TIRF, *total internal reflection fluorescence*), en la que se excitan los fluoróforos que se encuentran a una distancia muy pequeña (menos de 200 nm) del cubreobjetos. Esto da como resultado la capacidad de "ver" de forma clara las moléculas que están en la membrana celular con muy poco fondo de proteínas citoplásmicas marcadas fluorescentemente. Usando microscopía TIRF con células que expresan una cadena ligera de clatrina marcada con GFP o AP2, un grupo dirigido por Tom Kirchhausen en la Facultad de Medicina de Harvard pudo cuantificar los números típicos de clatrina y las proteínas adaptadoras necesarias para iniciar un evento endocitótico.[20] Descubrieron que el primer evento consistía por lo general en

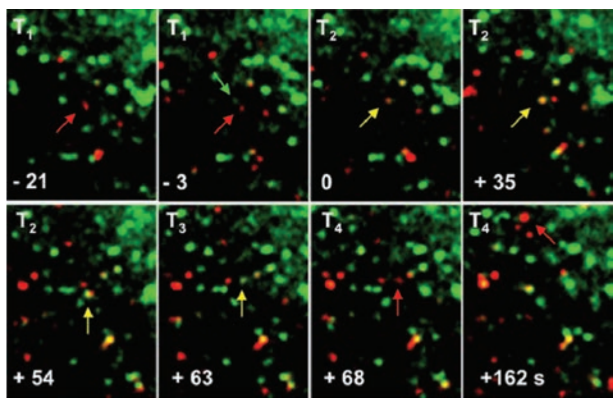



**FIGURA 6** Una serie de imágenes de fluorescencia que muestran la captura de una sola partícula de LDL fluorescente roja por un foso recubierto de clatrina fluorescente verde y su incorporación en una vesícula recubierta de clatrina, que se vuelve sin revestir y se mueve hacia el citoplasma. Los eventos se describen en el texto. $T_1$-$T_4$ representan los intervalos previos a la asociación ($T_1$), durante la asociación ($T_2$), el movimiento lateral de las articulaciones de LDL y clatrina antes de la separación ($T_3$) y el movimiento de LDL después del no revestimiento ($T_4$), respectivamente. Los tiempos se indican en segundos en cada cuadro, con 0 correspondiente al momento en que el LDL y la clatrina se asocian.

FUENTE: Tomada de Marcelo Ehrlich, *et al*. Cortesía de Tomas Kirchhausen. *Cell* 2004;118:597; reimpresa con permiso de Elsevier.

(*continúa*)

una sola molécula de clatrina capturada en la membrana por dos complejos AP2 unidos a la membrana. Si ocurre un segundo evento, que consiste en la asociación de otra clatrina con su propio par de AP2, lo suficientemente rápido (en un par de segundos), entonces el enrejado se estabiliza y es más probable que dé como resultado un evento endocítico completo.

## Referencias


1. Roth T. F. y Porter K. R. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Cell Biol* 1964;20:313-332.
2. Kanaseki T. y Kadota K. The "vesicle in a basket". *J Cell Biol* 1969;42:202-220 .
3. Pearse BMF. Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 1975;97:93-96 .
4. Pearse BMF. Clathrin: A unique protein associated with the intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1976;73:1255-1259 .
5. Brown M. S., Dana S. E. y Goldstein JL. Regulation of HMG CoA reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1973;70:2162-2166.
6. Goldstein J. L. y Brown M. S. Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of HMG CoA reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1973;70:2804-2808.
7. Brown M. S. y Goldstein J. L. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of HMG CoA reductase activity. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1974;71:788-792.
8. Anderson R. G. W, Goldstein J. L. y Brown M. S. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1976;73:2434-2438.
9. Anderson R. G. W., Brown M. S. y Goldstein J. L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 1977;10:351-364.
10. Anderson R. G. W., Goldstein J. L. y Brown M. S. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* 1977;270:695-699.
11. Brown M. S. y Goldstein J. L. Richard G. W. Anderson (1940-2011) and the birth of receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2011;193:601-603.
12. Davis CG, *et al*. The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia: Amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 1986;45:15-24.
13. Ohno H., *et al*. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 1995;269:1872-1874.
14. Owen D. J. y Evans P. R. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytic signals. *Science* 1998;282: 1327-1332.
15. Kelly B. T., *et al*. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 2008;456:976-979.
16. Traub L. M. Tickets to ride: Selecting cargo for clathrinregulated internalization. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2009;10:583-596.
17. Kelly B. T. y Owen DJ. Endocytic sorting of transmembrane protein cargo. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:404-412.
18. Reider A. y Wendland B. Endocytic adaptors—social networking at the plasma membrane. *J Cell Sci* 2011;124:1613-1622.
19. Ehrlich M., *et al*. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 2004;118:591-605.
20. Cocucci E, *et al*. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* 2012;180:495-507.

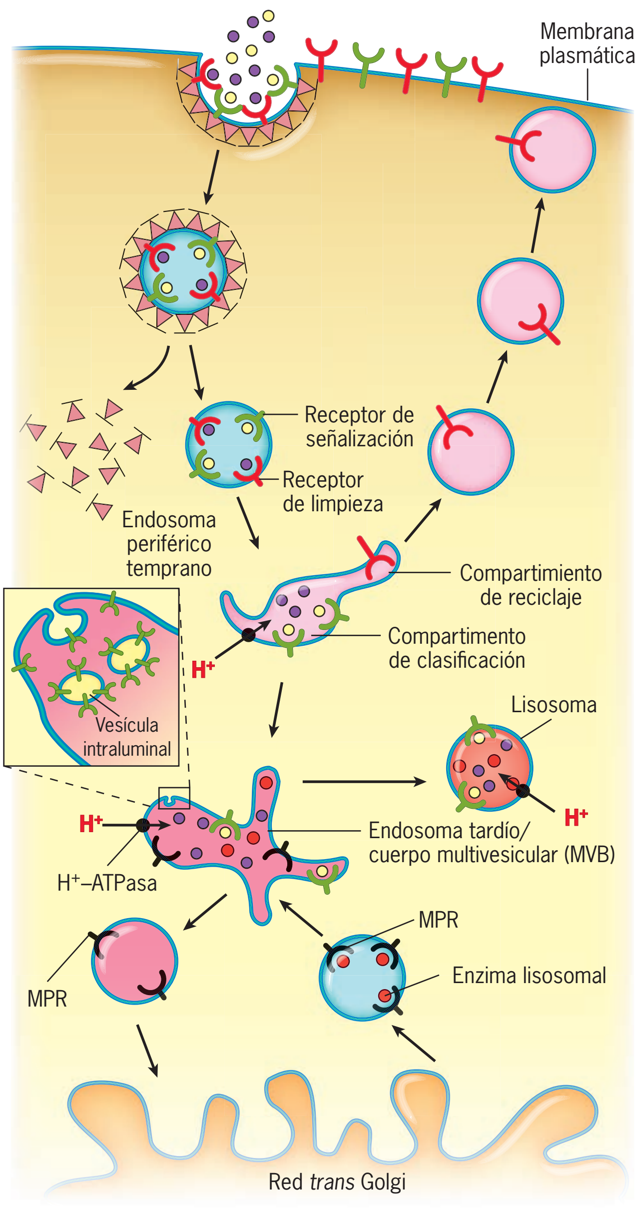



## 8.19 La vía endocítica

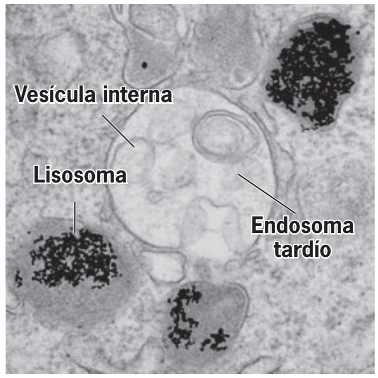
Las moléculas llevadas a una célula por endocitosis se enrutan a través de una vía endocítica bien definida (**FIGURA 8-43*a***). Antes de describir los eventos que ocurren a lo largo de la vía endocítica, vale la pena considerar dos tipos diferentes de receptores que son sometidos a endocitosis. Un grupo de receptores, al que nos referiremos como "receptores de limpieza", es responsable de la absorción de los materiales que utilizará la célula. Los ejemplos mejor estudiados son los receptores de transferrina y LDL (lipoproteína de baja densidad), que median la entrega a las células de hierro y colesterol, respectivamente. El receptor de LDL se discute en detalle al final de esta sección. El receptor coloreado en rojo de la figura 8-43 representa un receptor de mantenimiento. El segundo grupo de receptores, al que nos referiremos como "receptores de señalización", son responsables de unir ligandos extracelulares que llevan mensajes que cambian las actividades de la célula. Estos ligandos, que incluyen hormonas tales como insulina y factores de crecimiento como EGF, se unen al receptor de superficie (mostrado en verde en la figura 8-43*a*) y señalan una respuesta fisiológica dentro de la célula (discutido en detalles en el capítulo 15). La endocitosis del primer grupo de receptores conduce típicamente a la entrega de los materiales ligados, como hierro y colesterol, a la célula y el retorno del receptor a la superficie de la célula para rondas adicionales de captación. La endocitosis del segundo grupo de receptores a menudo conduce a la destrucción del receptor, un proceso llamado *regulación negativa del receptor*, que tiene el efecto de reducir la sensibilidad de la célula a la estimulación adicional por la hormona o el factor de crecimiento. La regulación negativa del receptor es un mecanismo por el cual las células regulan su capacidad para responder a los mensajeros extracelulares. Los receptores de señalización están típicamente marcados para la endocitosis y la posterior destrucción por la unión covalente de una "etiqueta" a la cola citoplásmica del receptor mientras está en la superficie de la célula. La etiqueta es una pequeña proteína llamada ubiquitina, que se agrega enzimáticamente. Las proteínas de la membrana que normalmente no están sujetas a la endocitosis se internalizan si están hechas para transportar una ubiquitina añadida.[6]

Después de la internalización, los materiales unidos a vesículas se transportan a una red dinámica de túbulos y vesículas conocidas colectivamente como **endosomas**, que representan centros de distribución a lo largo de la vía endocítica. El fluido en el lumen de los endosomas es acidificado por una $H^+$-ATPasa en la membrana límite. Los endosomas se dividen en dos clases: **endosomas tempranos**, que típicamente se localizan cerca de la región periférica de la célula, y **endosomas tardíos**, que típicamente se localizan más cerca del núcleo. De acuerdo con el modelo prevaleciente, los endosomas tempranos maduran de manera progresiva en endomatosos tardíos. Esta transformación de un endosoma temprano a uno tardío se caracteriza por una dis-

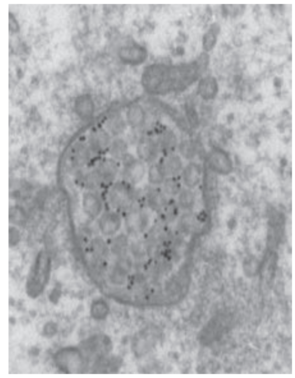
[6] En su mejor papel estudiado, la ubiquitina se une a una proteína para apuntar a esa proteína para su degradación como se discutió en la sección 12.21. Este tipo de señal de degradación se compone de varias moléculas de ubiquitina que están unidas entre sí (para formar una cadena de polubiquitina) mediante enlaces covalentes en un residuo específico en cada molécula de ubiquitina, nominada Lys48. Por el contrario, se piensa que la internalización de una proteína de membrana se desencadena por la unión a esa proteína de una única molécula de ubiquitina o cadena de poliubiquitina corta en la que las moléculas de ubiquitina están unidas a una Lys63 distinta de Lys48 (véase *Trends Cell Biol* 2001;21:647).




*a*)




*b*)



*c*)

**FIGURA 8-43 La vía endocítica.** *a*) El movimiento de materiales desde el espacio extracelular a los endosomas tempranos donde ocurre la clasificación. Se muestra endocitosis de dos tipos de complejos receptor-ligando. Los receptores de limpieza, como el receptor de LDL (que se muestra en rojo), normalmente se envían de vuelta a la membrana plasmática, mientras que sus ligandos (esferas azules) se transfieren a los endosomas tardíos. Los receptores de señalización, como el receptor de EGF (mostrado en verde), son típicamente transportados a endosomas tardíos junto con sus ligandos (amarillo). Los endosomas tardíos también reciben enzimas lisosomales recién sintetizadas (esferas rojas) de la TGN. Estas enzimas son portadas por los receptores de manosa 6-fosfato (MPR), que regresan a la TGN. El contenido de los endosomas tardíos se transfiere a los lisosomas por varias rutas (no mostradas). El recuadro de la izquierda muestra una vista ampliada de una porción de un endosoma tardío con una vesícula intraluminal que brota hacia adentro desde la membrana externa. Las membranas de estas vesículas contienen receptores para degradarse. *b*) Micrografía electrónica que muestra las vesículas internas dentro del lumen de un endosoma tardío. Varios lisosomas están presentes en la vecindad. *c*) Las partículas de oro vistas en esta micrografía electrónica (que aparecen como partículas negras bajo EM) se unen a receptores de EGF que se internalizaron por la endocitosis y se han localizado dentro de las membranas de las vesículas internas de este endosoma tardío.

FUENTE: *b*) Tomada de J. Paul Luzio, Paul R. Pryor y Nicholas A. Bright. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2007;8:625; © 2007, reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Ltd. *c*) Cortesía de Clare Futter.

minución del pH, un intercambio de proteínas Rab (p. ej., de Rab5 a Rab7) y un cambio importante en la morfología interna de las estructuras.

Los receptores que son absorbidos por endocitosis son transportados en vesículas a un endosoma temprano, que sirve como una estación de clasificación que dirige diferentes tipos de receptores y ligandos a lo largo de distintas vías (figura 8-43*a*). Los "receptores de limpieza" típicamente se disocian de sus ligandos unidos como resultado de la alta concentración de $H^+$ de los endosomas tempranos. Los receptores se concentran luego en compartimientos tubulares especializados del endosoma temprano, que representan centros de reciclado. Las vesículas que brotan de estos túbulos transportan los receptores a la membrana plasmática para obtener rondas adicionales de endocitosis (figura 8-43*a*). Por el contrario, los ligandos liberados (p. ej., las LDL) se concentran en un compartimiento de clasificación antes de despacharse a un endosoma tardío y finalmente a un lisosoma, donde se produce el procesamiento final. Como se indicó antes, los receptores de señalización con etiquetas de ubiquitina unidas no se reciclan a la membrana. En cambio, estos receptores ubiquitinados se secuestran en una población de pequeñas vesículas esféricas que se amontonan en el interior del endosoma tardío (figura 8-43*b*). Este proceso de vesiculación (que se muestra en el recuadro del lado izquierdo de la figura 8-43*a*) está orquestado por una serie de complejos proteicos (llamados complejos ESCRT). Cuatro complejos ESCRT diferentes actúan en secuencia para 1) ordenar los receptores ubiquitinados en un grupo dentro de la membrana endosomal tardía, 2) hacer que ese parche de membrana se invagine como brote en la luz del endosoma tardío y 3) cortar el cuello de la invaginación para liberar la vesícula intraluminal recién formada. La segregación de los receptores de señalización dentro del lumen de un endosoma tardío se muestra en la figura 8-43*c*). Debido a estas vesículas internas, los endosomas tardíos también se denominan cuerpos multivesiculares (MVBs, *multivesicular bodies*).

Entre muchos ejemplos de endocitosis mediada por receptor, el primero estudiado y mejor comprendido es aquel que proporciona a las células animales colesterol exógeno. Las células animales usan el colesterol como una parte esencial de sus membranas plasmáticas y como precursora de las hormonas esteroides.

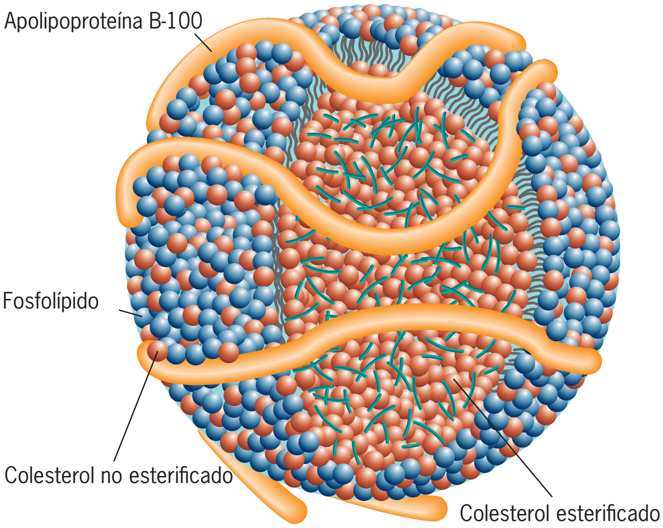



**FIGURA 8-44 Colesterol LDL.** Cada partícula consiste en moléculas de colesterol esterificadas, rodeadas por una capa monomolecular mixta de fosfolípidos y colesterol y una molécula simple de la proteína apolipoproteína B-100, que interactúa específicamente con el receptor de LDL que se proyecta desde la membrana plasmática.

El colesterol es una molécula hidrofóbica que se transporta en la sangre como parte de grandes complejos de lipoproteínas, como la *lipoproteína de baja densidad* (LDL, *low-density lipoprotein*) que se muestra en la **FIGURA 8-44**. Cada partícula de LDL contiene un núcleo central de casi 1 500 moléculas de colesterol esterificadas a ácidos grasos de cadena larga. El núcleo está rodeado por una sola capa de fosfolípidos que contiene una única copia de una proteína grande, llamada *apolipoproteína B-100*, que se une específicamente a los receptores LDL en las superficies de las células.

Los receptores de LDL se transportan a las membranas plasmáticas de las células, donde se concentran en fosas recubiertas, incluso en ausencia de ligando de LDL. Como resultado, los receptores están en la superficie de la célula listos para absorber las lipoproteínas transmitidas por la sangre si estuvieran disponibles. Una vez que las partículas de LDL se unen a un hoyo recubierto, el hoyo se invagina para formar una vesícula recubierta, el recubrimiento de clatrina se desensambla y los receptores de LDL pasan a través de los endosomas tempranos y regresan a la membrana plasmática, como se muestra en la figura 8-43*a*). Mientras tanto, las partículas de LDL se administran a los endosomas tardíos y a los lisosomas, donde el componente de la proteína se degrada y el colesterol se desesterifica y utiliza la célula en el ensamblaje de la membrana u otros procesos metabólicos (p. ej., la formación de hormonas esteroides). Las personas con un raro trastorno hereditario llamado *enfermedad de Niemann-Pick tipo C*, carecen de una de las proteínas necesarias para transferir el colesterol fuera de los lisosomas. La acumulación resultante de colesterol en estos organelos conduce a la degeneración nerviosa y la muerte durante la primera infancia. Los estudios de una enfermedad diferente que condujo al descubrimiento de la endocitosis mediada por receptor y la internalización de LDL se describen en las "Vías experimentales" acompañantes.

El nivel de LDL en la sangre se ha relacionado con el desarrollo de aterosclerosis, una condición caracterizada por la formación de placas en el revestimiento interno de las arterias que reducen el flujo de sangre a través del vaso y actúan como sitios para la formación de coágulos sanguíneos. Los coágulos de la sangre que bloquean las arterias coronarias son la principal causa de infarto de miocardio (ataque cardiaco). Los estudios sugieren que la aterosclerosis es el resultado de una respuesta inflamatoria crónica que se inicia por la deposición de LDL dentro de las paredes internas de los vasos sanguíneos, como se indica en la **FIGURA 8-45**. La reducción de los niveles de LDL en la sangre se logra con mayor facilidad mediante la administración de medicamentos llamados *estatinas* (p. ej., lovastatina y lipitor) que bloquean la HMG CoA reductasa, una enzima clave en la síntesis del colesterol (discutida en "Vías experimentales", sección 8.18). Cuando se reducen los niveles de colesterol en la sangre, se reduce el riesgo de ataque al corazón.

Las LDL no son los únicos agentes de transporte de colesterol en la sangre. Las *lipoproteínas de densidad alta* (HDL, *high-density lipoproteins*) tienen una construcción similar, pero contienen una proteína diferente (apolipoproteína A-I) y desempeñan un papel fisiológico diferente en el cuerpo. La LDL sirve en lo fundamental para transportar moléculas de colesterol del hígado, donde se sintetizan y empacan, a través de la sangre a las células del cuerpo. HDL lleva colesterol en la dirección opuesta. El exceso de colesterol se transporta fuera de la membrana plasmática de las células del cuerpo directamente a las partículas circulantes de HDL, que transportan el colesterol al hígado para su excreción. Justo como

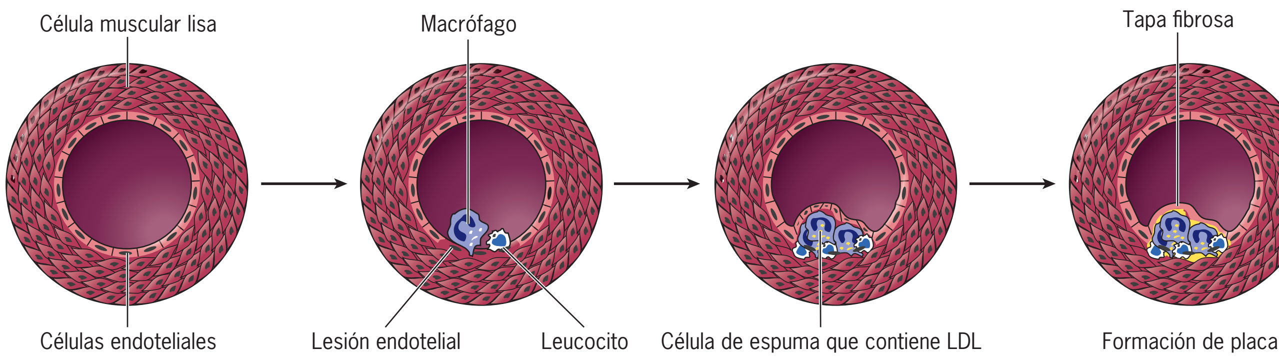



**FIGURA 8-45 Un modelo de formación de placa aterosclerótica.** De acuerdo con este modelo, la formación de placa se inicia por diversos tipos de lesiones en las células endoteliales que recubren el vaso, incluido el daño infligido por radicales libres de oxígeno que alteran químicamente las partículas de colesterol LDL. El endotelio lesionado actúa como un atrayente para los glóbulos blancos (leucocitos) y los macrófagos, que migran por debajo del endotelio y comienzan un proceso de inflamación crónica. Los macrófagos ingieren el LDL oxidado, que se deposita en el citoplasma como gotas de grasa rica en colesterol. Estas células se conocen como células espumosas y, a menudo, ya están presentes en los vasos sanguíneos de adolescentes y adultos jóvenes. Las sustancias liberadas por los macrófagos estimulan la proliferación de las células del músculo liso, que producen una matriz de tejido conectivo fibroso y denso (capa fibrosa) que sobresale en la luz arterial. Estas lesiones abultadas no solo restringen el flujo sanguíneo, sino que también son propensas a la ruptura, lo que puede desencadenar la formación de un coágulo sanguíneo y el consiguiente ataque cardiaco.

los altos niveles sanguíneos de LDL están asociados con un mayor riesgo de enfermedad cardiaca, se cree que los niveles altos de HDL se asocian con una disminución del riesgo, lo que ha llevado al HDL a llamarse "colesterol bueno". Hay pocas dudas de que la disminución de los niveles de LDL es beneficioso, pero las consecuencias de elevar los niveles de HDL es menos clara. Por ejemplo, las moléculas de colesterol pueden transferirse de las HDL a otras partículas de lipoproteínas mediante una enzima llamada proteína de transferencia colesteril-éster (CETP, *cholesteryl ester transfer protein*), una actividad que tiende a reducir los niveles de colesterol HDL. CETP se ha convertido en un foco de investigación tras el descubrimiento de una población de familias japonesas cuyos miembros viven rutinariamente más de 100 años y tienen mutaciones en el gen CETP. Varios inhibidores de CETP de peso molecular pequeño han sido probados en ensayos clínicos y se ha encontrado que aumentan los niveles de HDL en la sangre. Uno de estos fármacos candidatos (torcetrapib) se eliminó de un estudio posterior a pesar de que elevaba los niveles de HDL en sangre. Por razones que no están claras, los sujetos que tomaron el medicamento y una estatina fueron mucho más propensos a morir que aquellos en el grupo de control que solo tomaron la estatina. Otro estudio se centró en una mutación en una lipasa endotelial que causó un aumento en HDL. Aquellos con la mutación el estudio encontró que no tenían menor riesgo de ataques cardiacos.

Uno de los objetivos más prometedores para reducir el colesterol es PCSK9, una enzima proteolítica que destruye los receptores de LDL en el hígado. Las personas que tienen mutaciones inactivantes en el gen que codifica PCSK9 han reducido los niveles de colesterol LDL y disminuido la enfermedad cardiaca. Al menos dos inhibidores de PCSK9 (REGN727 y AMG145) se encuentran en ensayos clínicos.

**REPASO**

1. Describa los pasos que ocurren entre la unión de una partícula de LDL a la membrana plasmática de una célula y la entrada de moléculas de colesterol en el citosol.

## 8.20 Fagocitosis

La fagocitosis ("alimentación de las células") se lleva a cabo de forma extensiva por algunos tipos de células especializadas para la captación de partículas relativamente grandes (>0.5 μm de diámetro) del entorno. Muchos protistas unicelulares, como las amebas y los ciliados, se ganan la vida atrapando partículas de alimentos y organismos más pequeños y encerrándolos dentro de los pliegues de la membrana plasmática. Los pliegues se fusionan para producir una vacuola (o *fagosoma*) que se aprieta hacia adentro desde la membrana plasmática. El fagosoma se fusiona con un lisosoma y el material se digiere con el *fagolisosoma* resultante.

En la mayoría de los animales, la fagocitosis es un mecanismo de protección más que un modo de alimentación. Los mamíferos poseen una variedad de fagocitos "profesionales", incluidos macrófagos y neutrófilos, que deambulan a través de la sangre y los tejidos fagocitando a los organismos invasores, células muertas y dañadas, y desechos. Estos materiales son reconocidos y unidos por receptores en la superficie del fagocito antes de captarlos. Una vez dentro del fagocito, los microorganismos pueden ser destruidos por enzimas lisosomales o por radicales libres de oxígeno generados dentro del lumen del fagosoma. El proceso de envoltura de partículas se representa en la **FIGURA 8-46*a*)**. Los pasos en la digestión de materiales ingeridos se ilustran en la figura 8-46*b*). La ingestión del material fraccionado por la fagocitosis es conducida por actividades contráctiles de los microfilamentos que contienen actina que subyacen en la membrana plasmática.

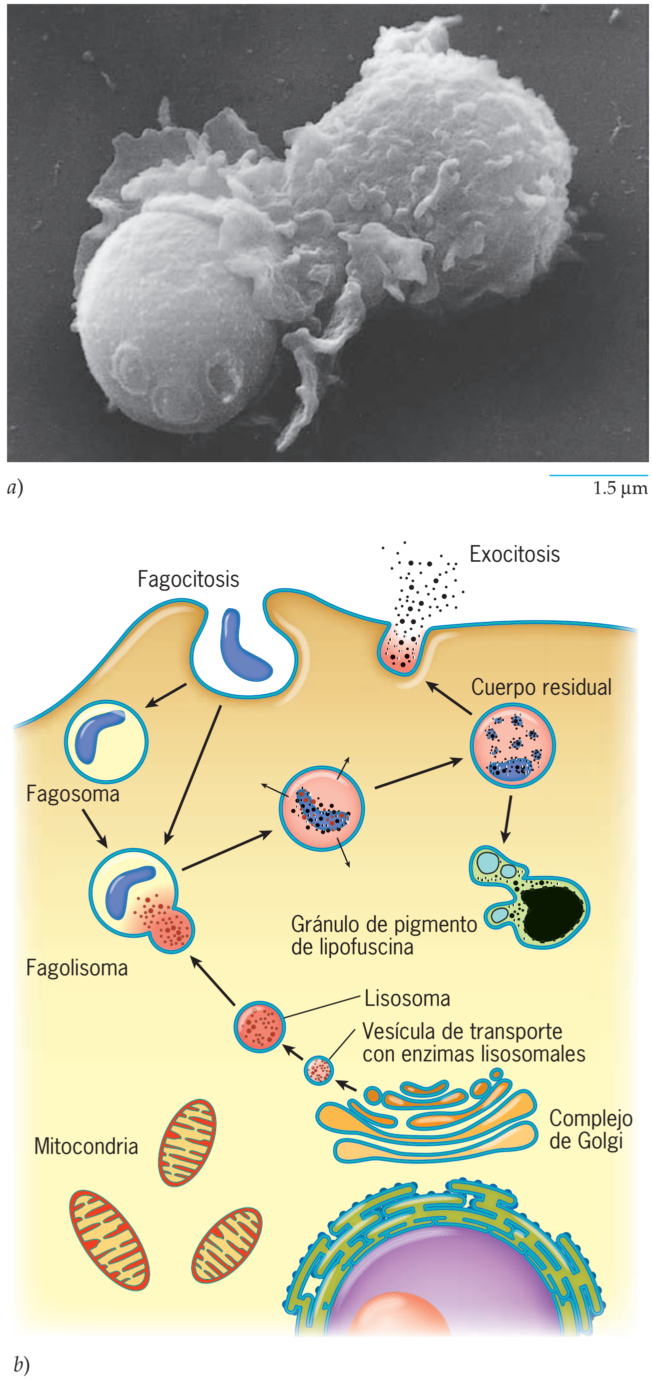



**FIGURA 8-46 Fagocitosis.** *a*) El proceso de ingestión, como se ilustra, de un leucocito polimorfonuclear que ingiere una célula de levadura (abajo a la izquierda). *b*) Los pasos que ocurren en la vía fagocítica (véase también página 292).

FUENTE: *a*) De Janet Boyles y Dorothy F. Bainton. *Cell* 1981;24:906, reimpresa con autorización de Elsevier.

No todas las bacterias ingeridas por las células fagocíticas se destruyen. De hecho, algunas especies secuestran la maquinaria fagocítica para promover su propia supervivencia en el cuerpo. *Mycobacterium tuberculosis*, el agente responsable de la tuberculosis, por ejemplo, es tomada en el citoplasma de un macrófago por

fagocitosis, pero la bacteria puede inhibir la fusión de su fagosoma con un lisosoma. Incluso si el fagosoma se vuelve demasiado ácido, la bacteria parece capaz de mantener su propio pH fisiológico a pesar del pH reducido de su medio circundante. La bacteria responsable de la fiebre Q, *Coxiella burnetii*, queda encerrada en un fagosoma que se fusiona con un lisosoma, pero ni el medio ácido ni las enzimas lisosomales pueden destruir el patógeno. *Listeria monocytogenes*, una bacteria que causa meningitis, produce proteínas que destruyen la integridad de la membrana lisosomal, permitiendo que la bacteria escape al citosol de la célula (véase sección 9.15).



**REPASO**

1. ¿Cómo se compara el papel de la fagocitosis en la vida de una ameba con su papel en un animal multicelular? ¿Cuáles son los principales pasos que ocurren durante la fagocitosis?

## 8.21 Captación postraduccional de proteínas por peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos

La división del contenido de una célula en un gran número de compartimientos presenta muchos desafíos organizativos para la maquinaria de tráfico de proteínas de la célula. Hemos visto en este capítulo que el tráfico de proteínas dentro de una célula eucariota se rige por 1) señales de clasificación, como el péptido señal de proteínas secretadas o grupos manosafosfato de enzimas lisosomales, y 2) receptores que reconocen estas señales y entregan proteínas que los contienen en el compartimiento adecuado. Cuatro de los principales organelos de la célula (núcleo, mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas) importan proteínas a través de una o más membranas externas limitantes. Como en el caso del ER rugoso, las proteínas que son importadas por estos organelos contienen secuencias de aminoácidos que sirven como direcciones que son reconocidas por los receptores en la membrana externa del organelo. A diferencia de ER rugoso, que por lo general importa sus proteínas cotraduccionalmente, las proteínas de estos otros organelos se importan después de la traducción, es decir, después de su síntesis completa en los ribosomas libres en el citosol. La importación de proteínas al núcleo es un tópico especializado y se analizará por separado en la sección 12.2. La importación de proteínas en los peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos se discutirá en las siguientes secciones.

### Captación de proteínas en los peroxisomas

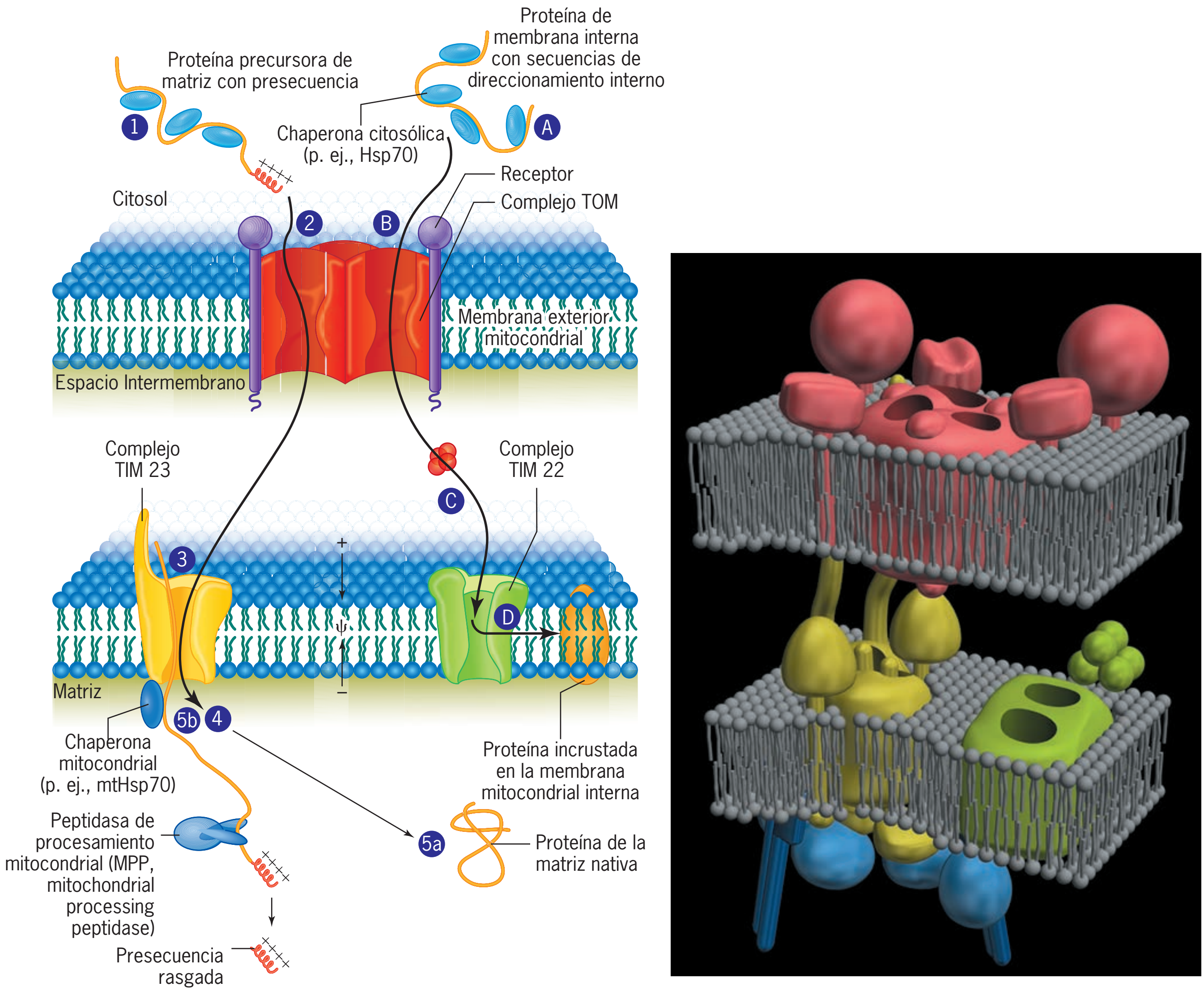
Los peroxisomas son organelos muy simples que tienen solo dos subcompartimientos en los que se puede colocar una proteína importada: la membrana límite y la matriz interna (sección 5.10). Las proteínas derivadas de un peroxisoma poseen una *señal de orientación peroxisomal*, ya sea una *PTS* para una proteína de matriz peroxisomal o una *mPTS* para una proteína de membrana peroxisomal. Se han identificado varios PTS, mPTS y receptores de PTS diferentes. Los receptores de PTS se unen a proteínas derivadas del peroxisoma con límite de eje en el citosol y las transportan a la superficie del peroxisoma, donde pueden ingresar al organelo. Estudios recientes han demostrado que los peroxisomas se forman a partir de la fusión de dos tipos distintos de vesículas derivadas de ER, cada una de las cuales porta la mitad del translocón peroxisomal (también llamado el importómero). La fusión de las vesículas permite la formación de un translocón peroxisomal completo, que luego facilita el movimiento de las proteínas en el peroxisoma. A diferencia de las mitocondrias y los cloroplastos, cuyas proteínas importadas deben asumir un estado desplegado, los peroxisomas son capaces de importar proteínas de la matriz peroxisomal en su conformación nativa plegada, incluso aquellas que constan de varias subunidades. El mecanismo por el cual los peroxisomas son capaces de lograr esta asignación desalentadora sigue siendo una cuestión de especulación.

### La absorción de proteínas en las mitocondrias

Las mitocondrias tienen cuatro subcompartimientos en los que se pueden liberar proteínas: una membrana mitocondrial externa (OMM, *outer mitochondrial membrane*), membrana mitocondrial interna (IMM, *inner mitochondrial membrane*), espacio intermembrana y matriz (véase figura 5-3*c*). Aunque las mitocondrias sintetizan algunos de sus propios polipéptidos integrales de membrana (13 en los mamíferos), cerca de 99% de las proteínas del organelo están codificadas por el genoma nuclear, se sintetizan en el citosol y se importan después de la traducción. Restringiremos la presente discusión a las proteínas de la matriz mitocondrial y la membrana mitocondrial interna, que juntas constituyen la gran mayoría de las proteínas dirigidas a este organelo. Al igual que con las proteínas peroxisomales y las proteínas de otros compartimientos, las proteínas mitocondriales contienen secuencias de señal que las dirigen a su base de origen. La mayoría de las proteínas de la matriz mitocondrial contienen una secuencia de selección extraíble (llamada *secuencia previa*) localizada en el extremo N de la molécula (paso 1, **FIGURA 8-47*a***). Una presecuencia típicamente incluye una cantidad de residuos cargados positivamente en una cara de la hélice y residuos hidrófobos en la cara opuesta. Por el contrario, la mayoría de las proteínas destinadas a la IMM contienen secuencias de direccionamiento interno que permanecen como parte de la molécula.

Antes de que una proteína pueda ingresar a una mitocondria, se cree que ocurren varios eventos. Primero, la proteína debe presentarse a la mitocondria en un estado relativamente extendido o desplegado (pasos 1 y A, figura 8-47*a*). Varias chaperonas moleculares diferentes (p. ej., Hsp70 y Hsp90) han sido implicadas en la preparación de polipéptidos para su captación en las mitocondrias, incluidas las que dirigen específicamente las proteínas mitocondriales a la superficie citosólica de la OMM (figura 8-47). El OMM contiene un complejo de importación de proteínas, el *complejo TOM*, que incluye 1) receptores que reconocen y unen proteínas mitocondriales y 2) canales revestidos de proteínas a través de los cuales los polipéptidos desplegados se translocan a través de la membrana externa (pasos 2 y B).[7] Las proteínas que están destinadas a la IMM o a la matriz deben pasar a través del espacio intermembrana y comprometer un segundo complejo de importación de proteínas ubicado en la IMM, llamado complejo TIM (figura 8-47*b*). La IMM contiene dos complejos principales de TIM: TIM22 y TIM23. TIM22 une proteínas integrales de la IMM que contienen una secuencia de direccionamiento interna y las inserta en la bicapa de lípidos (pasos C-D, figura 8-47*a*). TIM23, por el contrario, une proteínas con una presecuencia N terminal, que incluye todas las proteínas de la matriz (así como varias proteínas del IMM que no se discutirán).

[7] Es interesante observar que, a diferencia del translocón del ER o peroxisoma, la proteína formadora de poros del complejo TOM (Tom 40) es una proteína betabarril, como las otras proteínas integrales de la OMM (p. 172), que refleja su evolución desde la membrana externa de una bacteria ancestral. Esto tiene consecuencias funcionales, ya que la proteína betabarril no puede abrirse lateralmente para permitir que las proteínas integradas se inserten en la OMM. Como resultado, las proteínas OMM tienen que pasar al espacio intermembrana antes de ingresar a la bicapa OMM.




*a*) *b*)

**FIGURA 8-47 Importación de proteínas en una mitocondria.** *a*) Pasos propuestos tomados por las proteínas importadas después de la traducción en la matriz mitocondrial o en la membrana mitocondrial interna. El polipéptido se dirige a una mitocondria mediante una secuencia de direccionamiento, que se localiza en el extremo N-terminal en la proteína de la matriz (paso 1) y se localiza internamente en la mayoría de las proteínas de la membrana interna (paso A). Las moléculas citosólicas Hsp70 despliegan los polipéptidos antes de su entrada en la mitocondria. Las proteínas son reconocidas por los receptores de membrana (proteínas transmembrana rojas) y translocadas a través de la OMM por los poros en el complejo TOM de la OMM (paso 2 o B). La mayoría de las proteínas integrales de la IMM se dirigen al complejo TIM22 de la IMM (paso C), que las dirige a la bicapa lipídica de la IMM (paso D). Las proteínas de la matriz mitocondrial se translocan a través del complejo TIM23 de la IMM (paso 3). Una vez que la proteína entra en la matriz, se une a una chaperona mitocondrial (paso 4), que puede tirar del polipéptido a la matriz o actuar como un trinquete browniano para asegurarse de que se difunde en la matriz (estos mecanismos de chaperona alternativos se discuten en el texto). Una vez en la matriz, la proteína desplegada asume su conformación nativa (paso 5a) con la ayuda de chaperonas Hsp60 (no mostradas). La presecuencia se elimina enzimáticamente (paso 5b). *b*) Un modelo tridimensional de la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales, que muestra el número, el tamaño relativo y la topología de las diversas proteínas involucradas en esta actividad. El complejo TOM es de color rojizo, el complejo TIM23 es amarillo-verde, el complejo TIM22 es verde y los chaperones que cooperan son de color azul.

FUENTE: *b*) De Toshiya Endo, Hayashi Yamamoto y Masatoshi Esaki. *J Cell Science* 2003; cubierta del vol. 116, núm. 16; reproducida con permiso de The Company of Biologists, Ltd. http://jcs.biologists.org/content/116/16.cover-expansion.

TIM23 los reconoce y transloca completamente las proteínas de la matrix a través del IMM y dentro del compartimiento acuoso interno (paso 3, figura 8-47*a*). La translocación ocurre en sitios donde las membranas mitocondriales externas e internas se acercan mucho para que la proteína importada pueda atravesar ambas membranas de manera simultánea. El movimiento en la matriz es impulsado por el potencial eléctrico a través de la IMM actuando en la señal de orientación cargada positivamente; si el potencial se disipa mediante la adición de un fármaco como DNP (página 187), la translocación cesa.

A medida que ingresa en la matriz, un polipéptido interactúa con chaperonas mitocondriales, como mtHsp70 (paso 4, figura 8-47*a*), que ingresan inmediatamente en el compartimiento acuoso. Se han propuesto dos mecanismos para explicar la acción general de chaperonas moleculares implicadas en el movimiento de las proteínas a través de las membranas, que es un fenómeno generalizado. De acuerdo con una visión, las chaperonas actúan como motores generadores de fuerza que usan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para "tirar" activamente el polipéptido desplegado a través del poro de translocación. De acuerdo con la

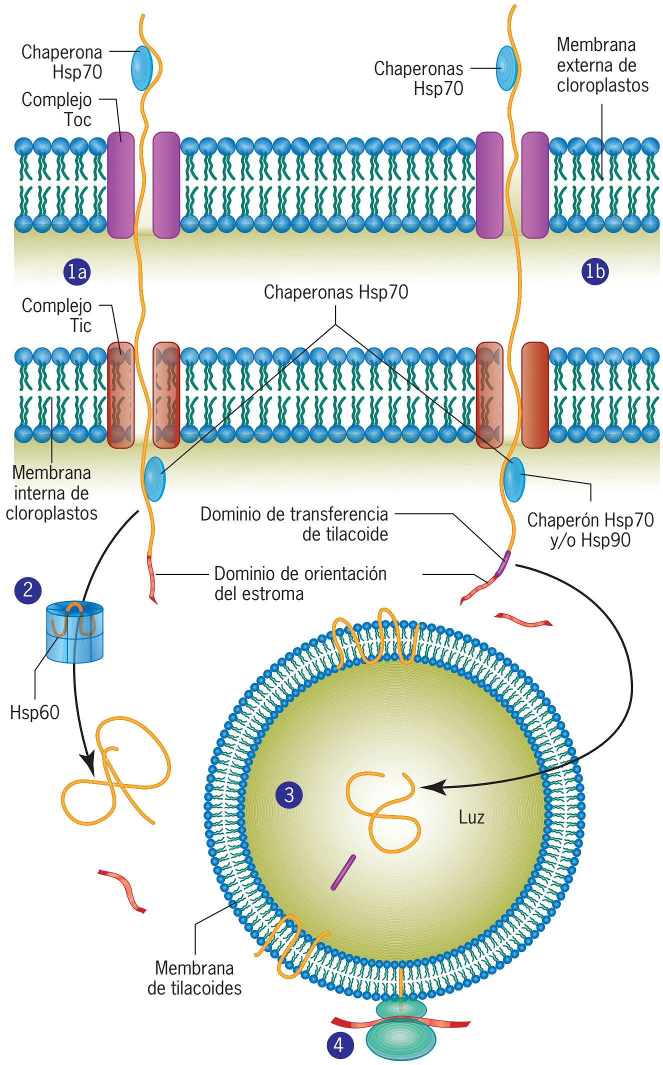



**FIGURA 8-48** Importar proteínas en un cloroplasto. Las proteínas codificadas por los genes nucleares se sintetizan en el citosol y se importan a través de poros revestidos de proteínas en ambas membranas de la envoltura externa del cloroplasto (paso 1). Las proteínas destinadas al estroma (paso 1a) contienen un dominio dirigido al estroma en su extremo N, mientras que las proteínas destinadas al tilacoide (paso 1b) contienen tanto un dominio dirigido al estroma como un dominio de transferencia de tilacoide en su extremo N. Las proteínas estromales permanecen en el estroma (paso 2) después de la translocación a través de la envoltura externa y la eliminación de su secuencia de direccionamiento única. La presencia del dominio de transferencia de tilacoides hace que las proteínas tilacoides se transloquen en o bien completamente a través de la membrana tilacoidal (paso 3). Varias proteínas de la membrana tilacoidal están codificadas por genes de cloroplastos y sintetizadas por ribosomas de cloroplastos que están unidos a la superficie externa de la membrana tilacoidal (paso 4).



vista alternativa, las chaperonas ayudan en la difusión del polipéptido a través de la membrana. La difusión es un proceso aleatorio en el que una molécula puede moverse en cualquier dirección disponible. Considere lo que sucedería si un polipéptido desplegado hubiera entrado en un poro de translocación en la membrana mitocondrial y hubiera "asomado su cabeza" en la matriz. Luego, considere lo que sucedería si una chaperona que reside en la superficie interna de la membrana pudiera unir el polipéptido saliente de tal manera que bloqueara la difusión del polipéptido a través del poro hacia atrás y hacia el citosol, pero no bloqueara su difusión más adentro de la matriz. A medida que el polipéptido se difunde aún más en la matriz, se lo unirá de forma repetida la chaperona y en cada etapa evitará que se difunda hacia atrás. Este mecanismo de acción chaperona se conoce como *difusión sesgada*, y se dice que la chaperona actúa como un "trinquete browniano", el término *browniano* implica difusión aleatoria, y un "trinquete" es un dispositivo que permite el movimiento en una sola dirección. Estudios recientes sugieren que ambos mecanismos de acción de acompañante quizá se utilicen y actúen de forma cooperativa. Independientemente del mecanismo de entrada, una vez en la matriz, el polipéptido alcanza su conformación nativa (etapa 5*a*, figura 8-47*a*) después de la eliminación enzimática de la secuencia previa (etapa 5*b*).

## La absorción de proteínas en los cloroplastos

Los cloroplastos tienen seis subcompartimientos en los que se pueden entregar proteínas: una membrana envolvente interna y externa y un espacio intermembrana intermedio, así como el estroma, la membrana tilacoide y la luz tilacoide (figura 8-48). Los mecanismos de importación de cloroplastos y mitocondrias muestran muchas similitudes, aunque sus mecanismos de translocación han evolucionado de forma independiente. Como en las mitocondrias,

1. La gran mayoría de las proteínas del cloroplasto (alrededor de 3 000 en las plantas más altas) se importan del citosol.
2. Las membranas de envoltura externa e interna contienen complejos de translocación distintos (*complejos Toc y Tic*, respectivamente) que funcionan juntos durante la importación.
3. Las chaperonas ayudan en el despliegue de los polipéptidos en el plegamiento de citosol y en las proteínas en el cloroplasto.
4. La mayoría de las proteínas destinadas al cloroplasto se sintetizan con una secuencia *N*-terminal móvil (denominada *péptido de tránsito*) que es muy variable en longitud y secuencia.

El péptido de tránsito hace mucho más que dirigir un polipéptido a un cloroplasto: proporciona una "dirección" que localiza el polipéptido en uno de varios subcompartimientos posibles dentro del organelo (figura 8-48). Todas las proteínas translocadas a través de la envoltura de cloroplastos contienen un *dominio de dirección del estroma* como parte de su péptido de tránsito, lo que garantiza que el polipéptido ingrese al estroma. Una vez en el estroma, el dominio de dirección del estroma se elimina mediante una peptidasa de procesamiento ubicada en ese compartimiento. Aquellos polipéptidos que pertenecen a una membrana de tilacoide o la luz del tilacoide llevan un segmento adicional en su péptido de tránsito, *denominado dominio de transferencia de tilacoides*, que dicta la entrada en los tilacoides. Se han identificado varias vías distintas por las cuales las proteínas se insertan

en la membrana del tilacoide o se translocan en la luz del tilacoide. Estas vías presentan sorprendentes similitudes con los sistemas de transporte de las células bacterianas, supuestos antepasados de los cloroplastos. Muchas de las proteínas que residen dentro de la membrana del tilacoide están codificadas por genes de cloroplastos y sintetizadas en los ribosomas unidos a la membrana del cloroplasto, como se ilustra en la figura 8-48, paso 4.

**REPASO**

1. ¿Cómo pueden las proteínas, como las enzimas del ciclo de TCA, llegar a la matriz mitocondrial?
2. ¿Cuál es el papel de las chaperonas citosólicas y mitocondriales en el proceso de importación mitocondrial?
3. Distinga entre dos posibles mecanismos de importación: difusión sesgada y motores generadores de fuerza.
4. Describa los pasos por los cuales un polipéptido se movería del citosol donde se sintetiza a la luz del tilacoide.

# Preguntas analíticas

1. ¿Cuál de los siguientes polipéptidos, si existe alguno, se espera que carezca de un péptido señal: colágeno, fosfatasa ácida, hemoglobina, proteínas ribosómicas, glucoforina, proteínas del tonoplasto?
2. Suponga que sospecha que un paciente puede estar sufriendo una enfermedad de células I (sección 8.12). ¿Cómo podría usted decidir si este diagnóstico fue correcto usando células que fueron cultivadas del paciente?
3. ¿En qué compartimiento celular se esperaría que una glucoproteína tenga su mayor contenido de manosa, su mayor contenido de *N*-acetilglucosamina y su mayor contenido de ácido siálico?
4. Se observó en la sección 8.21 que los peroxisomas pueden importar proteínas plegadas. Sin embargo, estos mismos organelos son impermeables a moléculas relativamente pequeñas como NADH y acetil-CoA. ¿Cómo es posible ser permeable a uno y no al otro?
5. Nombre dos proteínas que esperaría encontrar como componentes integrales de la membrana RER que estarían ausentes del SER. Nombre dos proteínas del SER que no estarían presentes en el RER.
6. Suponga que desea estudiar el proceso de secreción regulada en una célula que carecía de gránulos secretores maduros, es decir, vesículas que contienen material secretor que estaba listo para ser descargado. ¿Cómo podría obtener una célula que carezca de tales gránulos?
7. Se describió en la sección 8.12 cómo se podría preparar la glucocerebrosidasa que llevaba residuos de manosa al final de su superficie de oligosacáridos en lugar del azúcar, ácido siálico habitual. Una versión similar de la glucocerebrosidasa con residuos de manosa expuestos se produce mediante tecnología de DNA recombinante utilizando una línea especial de células. ¿Qué características cree que pueden exhibir estas células? Pista: la información para responder esta pregunta se proporciona en la figura 8-22.
8. La autorradiografía depende de partículas emitidas por átomos radiactivos que golpean una emulsión fotográfica que se encuentra en la parte superior de la sección del tejido. Cuando se desarrolla la emulsión, el sitio donde la partícula golpeó la emulsión aparece como un grano de plata, como en la figura 8-3*a*). ¿Cómo cree que el grosor de la sección podría afectar la resolución de la técnica, es decir, la capacidad de localizar el sitio preciso en la célula donde se incorpora la radiactividad?
9. ¿En qué parte de una célula esperaría la incorporación de los siguientes compuestos: [$^3$H] leucina, [$^3$H] ácido siálico, [$^3$H] manosa, [$^3$H] colina, [$^3$H] ácido glucurónico (un precursor de los GAGs), [$^3$H] pregnenolona (un precursor de las hormonas esteroides), [$^3$H] ramnosa en una célula de la planta (la ramnosa es un precursor de las pectinas)?
10. ¿Cuál de las siguientes células podría involucrarse más en la endocitosis en fase masiva: *a*) un eritrocito, *b*) una célula acinar pancreática, *c*) una célula de músculo esquelético? ¿Por qué?
11. ¿Esperaría que las propiedades del lado cisternal de las membranas de Golgi sean más similares a los lados extracelulares o citosólicas de la membrana plasmática? ¿Por qué?
12. ¿Qué compartimiento(s) de una célula se asocia(n) con cada uno de los siguientes elementos: clatrina, iones de calcio en una célula del músculo esquelético, dolicol fosfato, ribonucleasa y lipasa, digital, receptores de LDL, proteínas COPI, proteínas COPII, SRP no unidos?
13. Si una porción de tejido pancreático se hubiera incubado en [$^3$H] leucina de forma continua durante 2 horas, ¿dónde esperaría encontrar en las células acinares radiactividad incorporada?
14. Si tuviera que agregar un medicamento que interfiriera con la capacidad de los ribosomas para unirse al mRNA, ¿qué efecto se esperaría que esto tuviera en la estructura del RER?
15. No todos los receptores que llevan a cabo RME se ubican en fosas recubiertas antes de unirse al ligando, aunque también se concentran en fosas recubiertas antes de la internalización. ¿Cómo se supone que la unión de un ligando a un receptor haría que se concentrara en una fosa recubierta?
16. Se observó en el texto que los lisosomas carecen de una apariencia distintiva en el microscopio electrónico. ¿Cómo podría determinar si una determinada vacuola es de hecho un lisosoma?
17. Los estudios de un trastorno hereditario raro, la enfermedad de Dent, revelaron que estos individuos carecían de un canal de iones cloruro en los endosomas de las células de los túbulos renales. Estos pacientes padecían una variedad de síntomas que sugerían que sus compartimientos endosómicos no eran tan ácidos como los de las personas normales. ¿Cómo se supone que un defecto en un canal de cloruro podría explicar esta condición? (Véase **"Video tutorial cuantitativo"**).
18. Examine la micrografía de fluorescencia en la figura 8-20*d*). Aunque el complejo de Golgi está teñido de manera brillante, hay una fluorescencia roja dispersa en otras partes de la célula.

¿Cómo se puede explicar la presencia de esta tinción dispersa?

19. La figura 8-8*b*) muestra la localización de manosidasa II marcada con GFP en una célula tratada con un siRNA frente a una proteína que codifica mRNA implicada en un paso temprano en la vía secretora. ¿Cómo espera que aparezca el patrón de fluorescencia en una célula que ha sido tratada con un siRNA contra un mRNA que codifica la proteína GGA, la proteína clatrina o una proteína de la partícula de reconocimiento de señal?

# El citoesqueleto y la motilidad celular

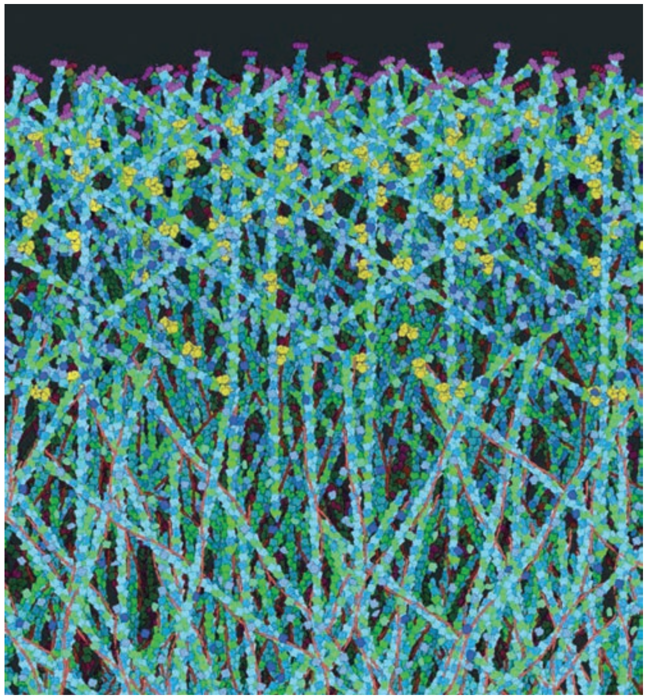
9 CAPÍTULO

## VENENOS, MEDICAMENTOS Y EL CITOESQUELETO

La *Amanita phalloides*, también conocida como sombrerillo u hongo de la muerte, es un pequeño hongo de apariencia inocua que se encuentra en regiones boscosas de Europa. A veces mal identificado por uno de sus primos comestibles, el hongo de la muerte ha sido responsable de la mayoría de las intoxicaciones por hongos en el mundo. El hongo de la muerte produce dos grupos principales de toxinas peptídicas multicíclicas: las amatoxinas, que son potentes inhibidores del RNA polimerasa II, y las falotoxinas. La faloidina, una de las falotoxinas producidas por este hongo, se aisló por primera vez en la década de 1930 y más adelante se descubrió que envenenaba las células uniéndose estrecha y específicamente a los filamentos de actina del citoesqueleto. Las mismas características que hacen que la faloidina sea una toxina efectiva también la han convertido en una poderosa herramienta para los biólogos celulares. Hoy en día la faloidina marcada fluorescentemente se encuentra de forma generalizada en los laboratorios de biología celular, ya que es uno de los principales medios para identificar y caracterizar el citoesqueleto de actina de las células fijadas bajo el microscopio óptico.

Otras toxinas del citoesqueleto han demostrado tener usos médicos importantes además de su utilidad en el laboratorio. Por ejemplo, los pedúnculodel azafrán de otoño (*Colchicum autumnale*) se han usado para tratar el dolor en las articulaciones y la gota desde la antigüedad. En la década de 1800, los químicos aislaron la actividad de una pequeña molécula a la cual llamaron colchicina. Los primeros estudios sobre las células revelaron que el tratamiento con

(*continúa*)



Las redes de actina del borde de ataque de una célula móvil se muestran en esta ilustración. La actina se muestra en tonos de azul y verde, limitando la proteína en púrpura, el Arp2/3 en amarillo y la tropomiosina en rosa.

FUENTE: Cortesía de Janet Iwasa y Dyche Mullins.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**9.1** Resumen de las principales funciones del citoesqueleto

**9.2** Estructura y función de los microtúbulos

**9.3** Proteínas motoras: las cinesinas y las dineínas

**9.4** Vía experimental: El tamaño del paso de la cinesina

**9.5** Centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, *microtubule-organizing centers*)

**9.6** La dinámica de los microtúbulos

**9.7** Estructura y función de los cilios y flagelos

**9.8** **PERSPECTIVA HUMANA:** El papel de los cilios en el desarrollo y las enfermedades

**9.9** Filamentos intermedios

**9.10** La actina

**9.11** La miosina: el motor molecular de la actina

**9.12** Organización muscular y contracción

**9.13** Las proteínas de unión a la actina

**9.14** Motilidad celular

**9.15** Vía experimental: El estudio de la motilidad basada en actina fuera de las células

**9.16** Procesos dependientes de actina durante el desarrollo

**9.17** El citoesqueleto bacteriano

colchicina resultó en una dramática detención de la metafase, con los cromosomas de muchas células totalmente condensados y alineados en el centro de la célula. Más tarde se descubrió que esta detención mitótica era el resultado de la alta afinidad de la colchicina a la tubulina, lo que impedía el ensamblaje de microtúbulos. La colchicina ha demostrado ser útil en los laboratorios, particularmente en los estudios de cariotipo, donde fue fundamental para determinar la cantidad correcta de cromosomas en humanos. La colchicina también continúa siendo uno de los medicamentos más recetados para el tratamiento de la gota, a pesar de su estrecho rango terapéutico (una medida de la diferencia entre una dosis tóxica y una terapéutica).

El taxol (también conocido por su nombre genérico, paclitaxel) es probablemente el fármaco citoesquelético más famoso. El efecto citotóxico del taxol se observó por primera vez en la década de 1960 durante una detección a gran escala de compuestos anticancerosos, en el que las células se trataron con un extracto de alcohol de la corteza de un tejo del Pacífico. Más tarde el taxol fue identificado como un ingrediente activo y recientemente se descubrió que es sintetizado por un hongo endosimbionte que vive en la corteza del tejo del Pacífico.

Al igual que la colchicina, se descubrió que el taxol se une específica y estrechamente a la tubulina, pero tiene un efecto muy diferente sobre los microtúbulos. En lugar de prevenir su polimerización, el taxol estabilizó los microtúbulos y evitó que se despolimerizaran. Este efecto se aprovechó en los laboratorios de biología celular, donde el taxol ha jugado un papel clave en el descubrimiento de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs, *microtubule-associated proteins*) y en el estudio de las proteínas motoras basadas en microtúbulos. En la clínica, el taxol ha tenido un gran impacto en el tratamiento del cáncer y se ha utilizado desde la década de 1980 como un agente quimioterapéutico clave para varios cánceres, incluidos los de mama, pulmón y ovario. Estos ejemplos ilustran solo algunas de las muchas moléculas pequeñas, naturales y sintéticas, que se ha encontrado que se dirigen específicamente a los componentes del citoesqueleto.

A medida que explore este capítulo, podría considerar las siguientes preguntas: ¿Qué aspectos de las proteínas del citoesqueleto los hacen más susceptibles como objetivos farmacológicos? ¿Puede pensar en otras formas de “administar fármacos” al citoesqueleto con un fin terapéutico?

## 9.1 Resumen de las principales funciones del citoesqueleto

El esqueleto de un vertebrado es un sistema familiar que consiste en elementos endurecidos que sostienen los tejidos blandos del cuerpo y desempeñan un papel clave en la mediación de los movimientos corporales. Las células eucariotas también poseen un “sistema esquelético”, un **citoesqueleto**, que tiene funciones análogas. El citoesqueleto está compuesto por tres estructuras filamentosas bien definidas: los **microtúbulos,** los **filamentos de actina** y los **filamentos intermedios**, que juntas forman una elaborada red interactiva y dinámica. Cada uno de los tres tipos de filamentos del citoesqueleto es un polímero de subunidades de proteínas unidas por enlaces débiles no covalentes. Este tipo de construcción se presta para el montaje y desmontaje rápido, que depende de la regulación celular compleja. Cada elemento del citoesqueleto tiene distintas propiedades. Los microtúbulos son tubos largos, huecos y no ramificados formados por subunidades de la proteína tubulina. Los filamentos de actina son estructuras sólidas y delgadas, a menudo organizadas en una red de ramificación. Los filamentos intermedios son fibras resistentes, similares a cuerdas, compuestas por una variedad de proteínas relacionadas. Las propiedades de los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de actina se resumen en la tabla 9.1.

En la **FIGURA 9-1** se muestra una descripción general de las principales actividades del citoesqueleto en tres células diferentes no musculares. Las células representadas en esta ilustración esquemática incluyen una célula epitelial polarizada, la punta de una célula nerviosa que se alarga y una célula cultivada en división. Como se discutirá en este capítulo, el citoesqueleto de estas células funciona como:

Un andamio dinámico que proporciona un soporte estructural, el cual puede determinar la forma de la célula y resistir las fuerzas que tienden a deformarla.

Un marco interno responsable de posicionar los diversos organelos dentro del interior de la célula. Esta función es particularmente evidente en células epiteliales polarizadas, como las representadas en la figura 8-11, en las que ciertos organelos están dispuestos en un orden definido desde el extremo apical hasta el basal de la célula.

**TABLA 9-1 Propiedades de los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de actina**

| | Microtubulos | Filamentos intermedios | Filamentos de actina |
|---|---|---|---|
| Subunidades incorporadas en el polímero | Heterodímero GTP-alfa-betatubulina | ~70 proteínas diferentes, probablemente incorporadas como tetrámeros | Monómeros de ATP-actina |
| Sitio preferencial de la incorporación | Extremo + (Betatubulina) | Interno | Extremo + (púas) |
| Polaridad | Sí | No | Sí |
| Actividad enzimática | GTPasa | Ninguna | ATPasa |
| Proteínas motoras | Cinesinas, dineínas | Ninguna | Miosinas |
| Grupo principal de proteínas asociadas | MAP | Plaquinas | Proteínas de unión con actina |
| Estructura | Tubo rígido, hueco, inextensible | Filamento resistente, flexible y extensible | Filamento helicoidal flexible e inextensible |
| Dimensiones | Diámetro externo de 25 nm | 10–12 nm diam. | 8 nm diam. |
| Distribución | Todos los eucariotas | Animales | Todos los eucariotas |
| Funciones principales | Soporte, transporte intracelular, organización celular | Soporte estructural, resistencia mecánica | Motilidad, contractilidad, transporte intracelular |
| Distribución subcelular | Citoplasma | Citoplasma + núcleo | Citoplasma |

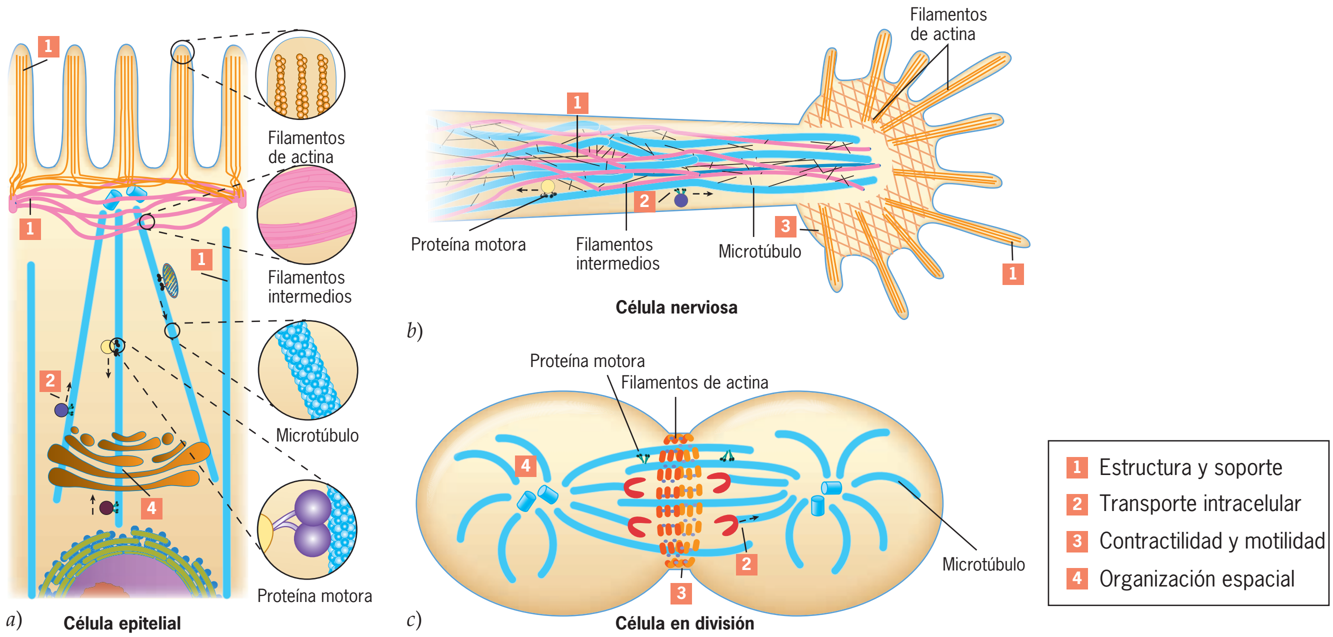



**FIGURA 9-1 Una visión general de la estructura y funciones del citoesqueleto.** Dibujos esquemáticos de *a*) una célula epitelial, *b*) una neurona y *c*) una célula en división. Los microtúbulos del epitelio y las neuronas funcionan principalmente en soporte y transporte de organelos, mientras que los microtúbulos de la célula en división forman el huso mitótico requerido para la segregación cromosómica. Los filamentos intermedios proporcionan soporte estructural tanto para la célula epitelial como para la neurona. Los microfilamentos soportan las microvellosidades de la célula epitelial y son una parte integral de la maquinaria móvil implicada en la elongación neuronal y la división celular.

Una red de rieles que dirigen el movimiento de materiales y organelos dentro de las células. Los ejemplos de esta función incluyen la entrega de moléculas de mRNA a partes específicas de una célula, el movimiento de portadores membranosos desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi y el transporte de vesículas que contienen neurotransmisores a lo largo de una célula nerviosa. La **FIGURA 9-2** muestra una pequeña porción de una célula cultivada, y es evidente que la mayoría de los organelos fluorescentes verdes, que son peroxisomas marcados (página 217), están estrechamente asociados con los microtúbulos (rojo) del citoesqueleto de la célula. Los microtúbulos son los rieles sobre las cuales se transportan los peroxisomas en células de mamífero.

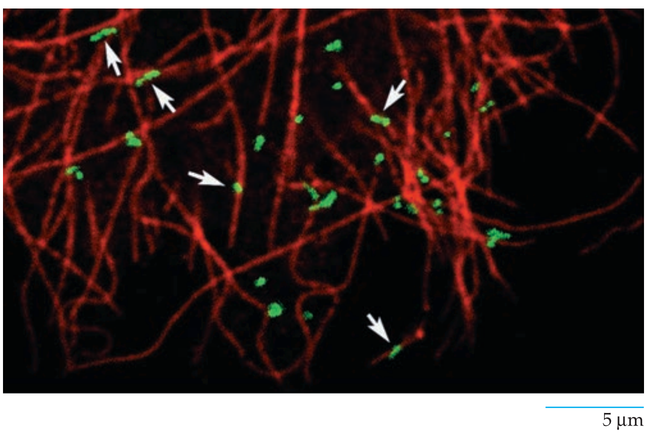



**FIGURA 9-2** Un ejemplo del papel de los microtúbulos en el transporte de organelos. Los peroxisomas de esta célula (se muestran en verde y se indican por flechas) están estrechamente asociados con los microtúbulos del citoesqueleto (que se muestran en rojo). Los peroxisomas aparecen verdes porque contienen una proteína peroxisómica fusionada a la proteína verde fluorescente (sección 18.3). Los microtúbulos aparecen rojos porque están teñidos con un anticuerpo marcado fluorescentemente.

FUENTE: De EAC Weimer, *et al. J Cell Biol* 1997;136:78, Cortesía de S Subramani, fig. 6. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

El aparato generador de fuerza que mueve las células de un lugar a otro. Los organismos unicelulares se mueven “arrastrándose” sobre la superficie de un sustrato sólido o impulsándose a través de su entorno acuoso con la ayuda de organelos locomotores (cilios y flagelos) especializados que contienen microtúbulos y que sobresalen de la superficie de la célula. Los animales multicelulares tienen una variedad de células que son capaces de una locomoción independiente, incluidos los espermatozoides, los leucocitos y los fibroblastos. La punta de un axón en crecimiento también es muy móvil (figura 9-1), y su movimiento se asemeja a una célula que se arrastra.

Un componente esencial de la maquinaria de división de la célula. Los elementos del citoesqueleto constituyen el aparato responsable de separar los cromosomas durante la mitosis y la meiosis y de dividir la célula madre en dos células hijas durante la citoquinesis. Estos eventos se discuten detalladamente en el capítulo 14.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son las cinco funciones del citoesqueleto?

## 9.2 Estructura y función de los microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras tubulares huecas que se ensamblan a partir de la proteína tubulina. Se encuentran en el citoesqueleto, el huso mitótico, los centriolos y el núcleo de cilios y flagelos. Funcionan en diversas actividades, como el soporte de la célula y el movimiento de materiales entre la célula y las terminales de una neurona.

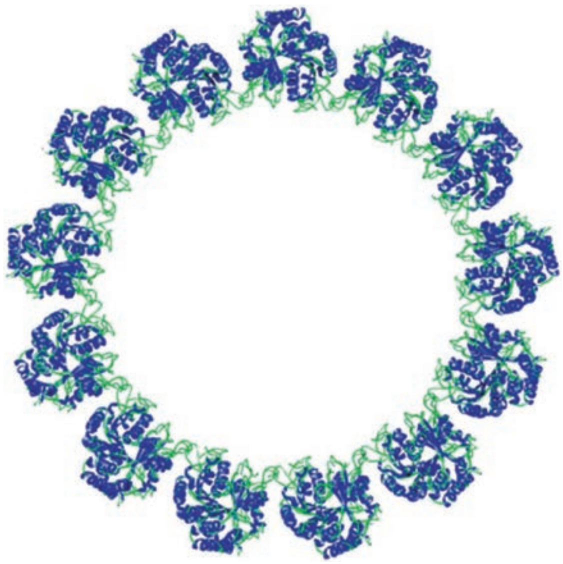
## Estructura y composición de los microtúbulos

Como su nombre lo indica, los microtúbulos son estructuras huecas, relativamente rígidas, tubulares, y se dan casi en todas las células eucariotas. Los microtúbulos son componentes de un conjunto diverso de estructuras, incluyendo el huso mitótico de las células en división y el centro de los cilios y flagelos. Tienen un diámetro exterior de 25 nm, un grosor de pared de aproximadamente 4 nm y pueden extenderse a lo largo o ancho de una célula. La pared de un microtúbulo está compuesto por proteínas globulares dispuestas en filas longitudinales, denominadas *protofilamentos*, que están alineadas en paralelo al eje largo del túbulo (**FIGURA 9-3*a***). Cuando se ve en sección transversal, se observa que los microtúbulos consisten en 13 **protofilamentos** alineados uno al lado del otro en un patrón circular dentro de la pared (figura 9-3*b*). Se cree que las interacciones no covalentes entre protofilamentos adyacentes juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de los microtúbulos.

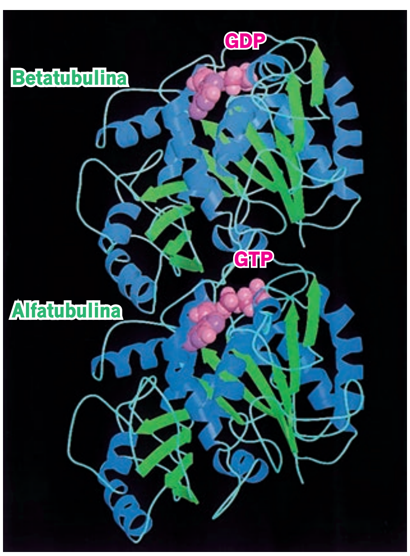
Cada protofilamento se ensambla a partir de bloques de construcción de dímeros que constan de una subunidad alfatubulina y de una subunidad betatubulina. Los dos tipos de subunidades de tubulina globulares tienen una estructura tridimensional similar y se ajustan estrechamente juntos como se muestra en la figura 9-3*c*. Los dímeros de tubulina se organizan en una serie lineal a lo largo de la longitud de cada protofilamento, como se muestra en la figura 9-3*d*. Debido a que el montaje de cada unidad contiene dos componentes no idénticos (un heterodímero), el protofilamento es asimétrico, con una alfatubulina en un extremo y una betatubulina en el otro extremo. Todos los protofilamentos de un microtúbulo tienen la misma polaridad. En consecuencia, todo el polímero tiene la misma polaridad. Un extremo de un microtúbulo se conoce como el extremo más y termina con una fila de subunidades de betatubulina (figura 9-3*d*). El extremo opuesto es



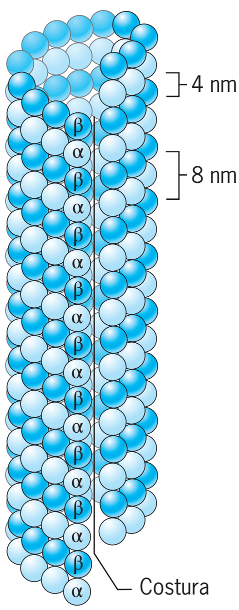
*a*) 100 nm



*b*)




*c*)




*d*)

**FIGURA 9-3 La estructura de los microtúbulos.** *a*) Micrografías electrónicas de microtúbulos del cerebro teñidos negativamente que muestran las subunidades globulares que forman los protofilamentos. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), se discuten más adelante. *b*) Microfotografía electrónica de una sección transversal a través de un microtúbulo de una célula de la punta de la raíz de Juniperus que revela las 13 subunidades dispuestas dentro de la pared del túbulo. Los microtúbulos de estas células son más abundantes en una zona cortical de aproximadamente 100 nm de espesor justo debajo de la membrana plasmática (se ve en la parte inferior derecha de la micrografía). *c*) Un modelo de cinta que muestra la estructura tridimensional del heterodímero alfa-betatubulina. Tenga en cuenta las formas complementarias de las subunidades en sus superficies interactuantes. La subunidad alfatubulina tiene un GTP unido, que no se hidroliza y no es intercambiable. La subunidad betatubulina tiene un GDP unido, que se intercambia por un GTP antes del ensamblaje en un polímero (sección 9.6). El extremo más del dímero está en la parte superior. *d*) Diagrama de una sección longitudinal de un microtúbulo que se muestra en la red B, la cual es la estructura que se piensa que ocurre en la célula. La pared consta de 13 protofilamentos que consisten en heterodímeros alfa-betatubulina apilados en una disposición de cabeza a cola. Los protofilamentos adyacentes no están alineados en el registro, sino que están escalonados a aproximadamente 1 nm de modo que las moléculas de tubulina forman una matriz helicoidal alrededor de la circunferencia del microtúbulo. La hélice se interrumpe en un sitio donde las subunidades alfa y beta hacen contactos laterales. Esto produce una "costura" que corre a lo largo del microtúbulo.

FUENTE: *a*) De Linda A Amos. *J Cell Biol* 1977;72:645, Fig. 2; Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *b*) Sui, H y Downing, K. H. *Base estructural de interacción interprotofilamento y deformación lateral de microtúbulos. Estructura* 2010;18(8):1022-1031. *c*) Cortesía de Eva Nogales y Kenneth Downing.

el extremo menos y termina con una fila de subunidades de alfatubulina. Como se discutirá más adelante en este capítulo, la polaridad estructural de los microtúbulos es un factor importante en el crecimiento de estas estructuras y en su capacidad para participar en actividades mecánicas dirigidas.

## Proteínas asociadas a microtúbulos

Los microtúbulos preparados a partir de tejido vivo que normalmente contienen proteínas adicionales, se llaman **proteínas asociadas a microtúbulos** (o **MAP**). Las MAP comprenden una colección heterogénea de proteínas. Las primeras MAP que se identifican se conocen como "MAP clásicas" y generalmente tienen un dominio que se une al lateral de un microtúbulo y otro dominio que sobresale hacia afuera como una cola desde la superficie del microtúbulo. La unión de una de estas MAP a la superficie de un microtúbulo se representa en la **FIGURA 9-4**. Algunas MAP se pueden ver en micrografías electrónicas como puentes cruzados que conectan los microtúbulos entre sí, manteniendo así su alineación paralela. Las MAP aumentan la estabilidad de los microtúbulos y promueven su ensamblaje. La actividad de unión a microtúbulos de las diversas MAP se controla principalmente mediante la adición y eliminación de grupos fosfato de residuos particulares de aminoácidos. Un nivel anormalmente alto de fosforilación de una MAP particular, llamado tau, se ha visto implicado en el desarrollo de varios trastornos neurodegenerativos mortales, incluida la enfermedad de Alzheimer (sección 2.13). Los filamentos enredados (llamados marañas neurofibrilares) son moléculas que están excesivamente fosforiladas y son incapaces de unirse a los microtúbulos. Los filamentos neurofibrilares contribuyen a la muerte de las células nerviosas, pero si estos filamentos en realidad provocan la degeneración neuronal o si son solo una consecuencia de la muerte neuronal continúa siendo un tema controvertido. Alguna evidencia sugiere que agregados más pequeños de tau interfieren con el transporte largo axonal antes de que se formen los marañas neurobrillares. Pero mientras que el papel tau como causante de la enfermedad de Alzheimer continúa siendo una interrogante, se sabe que las mutaciones en tau son la causa directa de otra enfermedad neurodegenerativa llamada demencia frontotemporal y parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP-17, para abreviar). El hecho de que las mutaciones en el tau puedan causar tal demencia, que representa aproximadamente 5% de los casos hereditarios de demencia frontotemporal, demuestra que el tau puede volverse tóxico para las neuronas y, por tanto, confirma el papel del tau como causante del Alzheimer y otras demencias.





## Microtúbulos como soportes estructurales y organizadores

Los microtúbulos son lo bastante rígidos para resistir las fuerzas que podrían comprimir o doblar la fibra. Esta propiedad les permite brindar soporte mecánico, tal como las vigas de acero soportan un edificio alto de oficinas o los postes la estructura de una tienda de campaña. La distribución de microtúbulos citoplásmicos en una célula ayuda a determinar la forma de esa célula. En las células de animales cultivadas, los microtúbulos se extienden en una disposición radial hacia afuera del área alrededor del núcleo, dando a estas células su forma redonda y aplanada (**FIGURA 9-5**). En contraste, los microtúbulos de las células epiteliales columnares se caracterizan típicamente por su eje longitudinal paralelo al eje largo de la célula (figura 9-1*a*). Esta configuración sugiere que los microtúbulos ayudan a soportar la forma alargada de la célula. El papel de los microtúbulos es particularmente evidente en ciertos procesos celulares muy alargados, como los cilios, los flagelos y los axones de las células nerviosas.

En las células vegetales, los microtúbulos juegan un papel indirecto en el mantenimiento de la forma de las células a través de su influencia en la formación de la pared celular. Durante la interfase, la mayoría de los microtúbulos de la planta se encuentran justo debajo de la membrana plasmática, formando una zona cortical distinta. La enzima en la que se basa la celulosa de la pared celular, celulosa sintasa (véase figura 7-34) es una proteína transmembranal cuyo lado citoplasmático está unido físicamente a los microtúbulos corticales a través de la proteína interactiva de celulosa sintasa 1 (CSI1, *cellulose synthase interactive protein 1*). Como resultado, las microfibras de celulosa de la pared celular se ensamblan en una orientación que es paralela a los microtúbulos subyacentes de la corteza (**FIGURA 9-6**). La orientación de estas microfibras de celulosa juega un papel importante en la determinación de las características de crecimiento de la célula y su forma. En la mayoría de células, las microfibrillas de celulosa y los microtúbulos recién sintetizados se han coalineado, dispuestos en forma perpendicular al eje largo de la célula (transversalmente), al igual que los aros alrededor de un barril (figura 9-6). Debido a que las

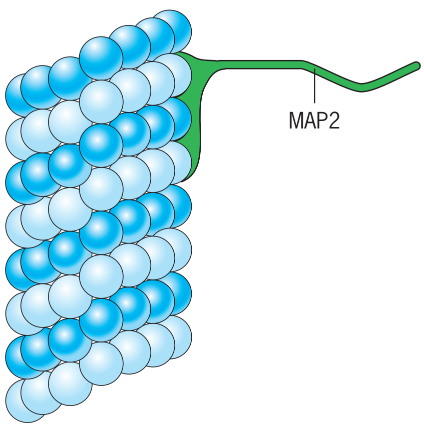



**FIGURA 9-4 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAP).** Diagrama esquemático de una molécula cerebral MAP2 unida a la superficie de un microtúbulo. La molécula MAP2 mostrada en esta figura contiene tres sitios de unión a tubulina conectados por segmentos cortos de la cadena polipeptídica. Una isoforma alternativa contiene cuatro sitios de unión, espaciados a una distancia suficiente para permitir que la molécula MAP2 se una a tres subunidades separadas de tubulina en la pared de los microtúbulos. Las colas del MAP proyectan moléculas hacia afuera, lo que les permite interactuar con otros componentes celulares.

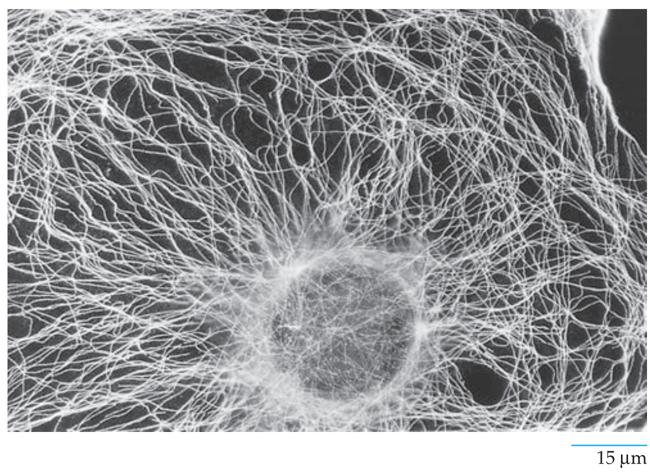



**FIGURA 9-5 La localización de microtúbulos de una célula de ratón cultivada aplanada se revela mediante anticuerpos fluorescentes antitubulina.** Se ve que los microtúbulos se extienden desde la región perinuclear de la célula en una matriz radial. Se pueden seguir microtúbulos individuales y se observa que se curvan gradualmente a medida que se adaptan a la forma de la célula.

FUENTE: De Mary Osborn y Klaus Weber. *Cell* 1977;12:563, con permiso de Elsevier.

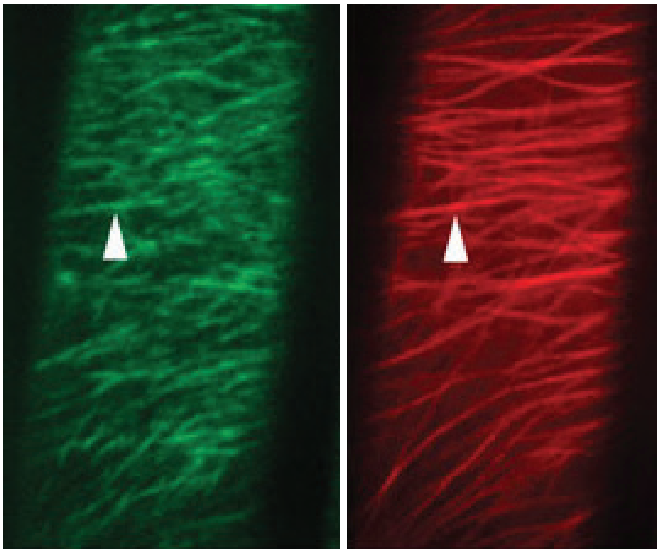


**FIGURA 9-6 Visualización del tejido de celulosa sintetasa con microtúbulos.** Las células de Arabidopsis que coexpresan los complejos de celulosa sintetasa marcados fluorescentemente (verde) y los microtúbulos (rojo) muestran la colocalización (punta de flecha).

FUENTE: De Paradez, *et al*. *Science* 312(3):1491-1495.

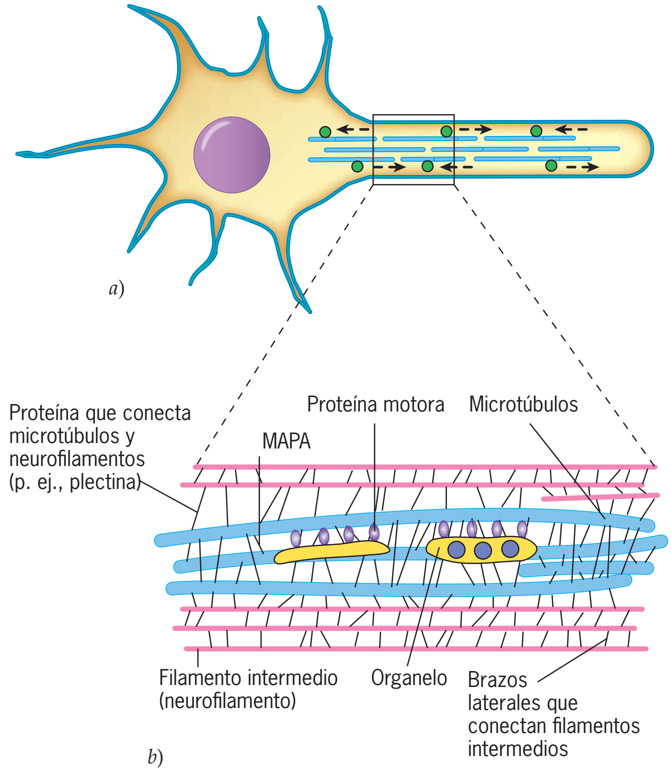
microfibrillas de celulosa resisten la expansión lateral, la presión de turgencia ejercida por el fluido en la vacuola de la célula se dirige a los extremos de ella, causando su alargamiento.

Los microtúbulos también juegan un papel clave en el mantenimiento de la organización interna de las células. El tratamiento de las células con fármacos que alteran los microtúbulos puede afectar seriamente la ubicación de las membranas orgánicas, incluido el complejo ER y Golgi. El complejo de Golgi se organiza típicamente como una sola cinta ubicada cerca del centro de una célula de mamífero (véase figura 8-20*c*), justo fuera del núcleo. El tratamiento de células con nocodazol o colchicina, que promueve el desmontaje de los microtúbulos, puede dispersar los elementos de Golgi en pilas de Golgi separadas y diseminadas por todo el citoplasma. Cuando se elimina el medicamento y los microtúbulos se vuelven a ensamblar, las membranas de Golgi vuelven a su posición normal en el interior de la célula.

## Microtúbulos como agentes de la motilidad intracelular

Las células vivas con macromoléculas y organelos se mueven de manera directa de un lugar a otro. Si bien esta intensa actividad se puede apreciar observando el movimiento de los materiales en las partículas de una célula viva, los procesos subyacentes suelen ser difíciles de estudiar porque la mayoría de las células carecen de un citoesqueleto altamente ordenado. Sabemos, por ejemplo, que el transporte de materiales de un compartimiento de membrana a otro depende de la presencia de microtúbulos debido a que la interrupción específica de estos elementos del citoesqueleto detiene los movimientos. En las células nerviosas, los movimientos intracelulares dependen de una disposición altamente organizada de microtúbulos y otros filamentos del citoesqueleto.

El axón de una neurona motora individual puede extenderse desde la médula espinal hasta la punta de un dedo de la mano o del pie. El centro de fabricación de esta neurona es su cuerpo celular, una porción redondeada de la célula que reside dentro de la médula espinal. Cuando los aminoácidos marcados se inyectan en el cuerpo de la célula, se incorporan en sus proteínas. Muchos materiales diferentes, incluyendo moléculas neurotransmisoras, están compartimentadas dentro de vesículas membranosas en el complejo de ER y Golgi del cuerpo de la célula y luego se trans-



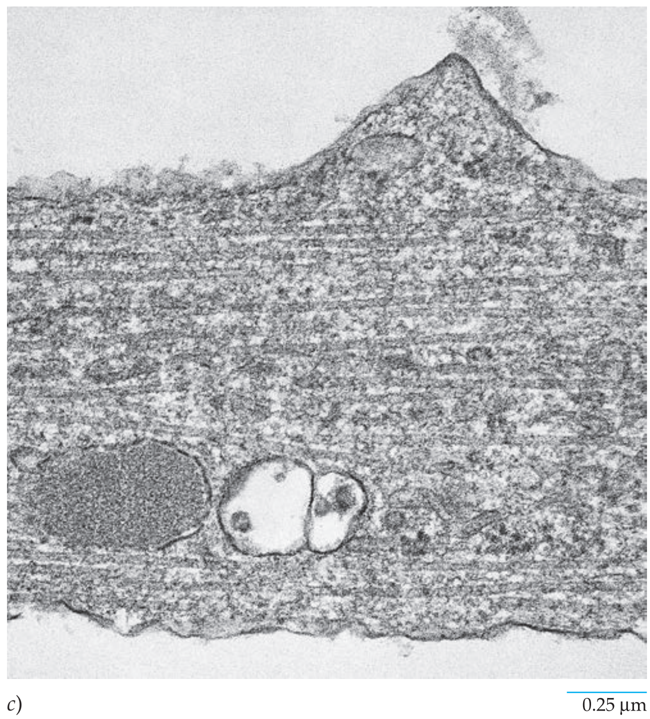
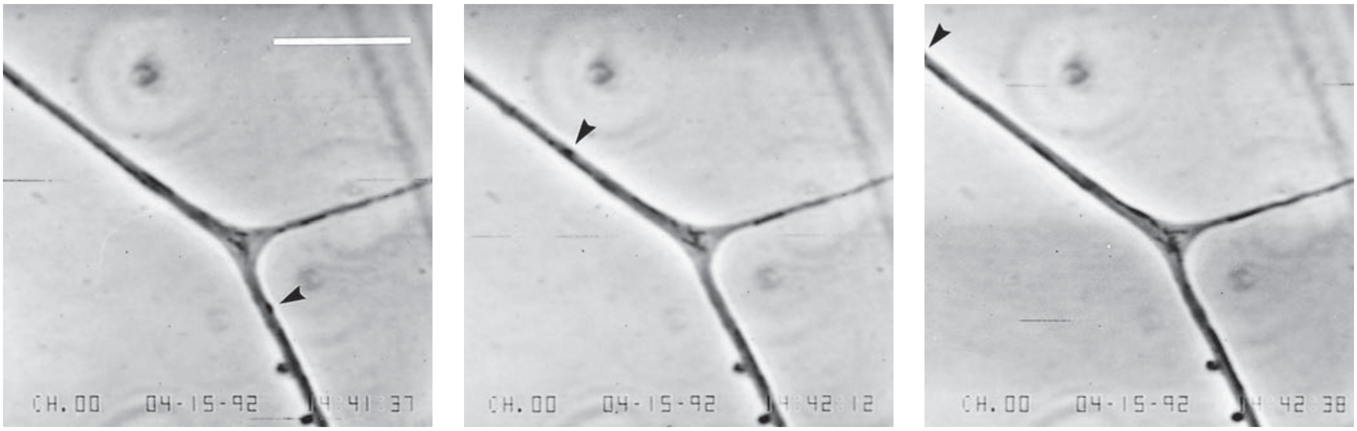




**FIGURA 9-7 Transporte axonal.** *a*) Dibujo esquemático de una célula nerviosa que muestra el movimiento de vesículas a lo largo de un axón y de pistas de microtúbulos. Las vesículas se mueven en ambas direcciones dentro del axón. *b*) Dibujo esquemático de los microtúbulos y filamentos intermedios (neurofilamentos) dentro de un axón. Vesículas que contienen proteínas de entrecruzamiento, que incluyen proteínas motoras, como cinesina y dineína. *c*) Micrografía electrónica de una porción de un axón de una célula nerviosa cultivada, que muestra los numerosos microtúbulos paralelos que funcionan como pistas para el transporte axonal. Los dos organelos unidos a la membrana que se muestran en esta micrografía se observaron bajo un microscopio óptico para moverse a lo largo del axón en el momento en que se fijó la célula nerviosa.

FUENTE: De AC Breuer, CN Christian, M Henkart, y PG Nelson. *J Cell Biol* 1975;65:568, fig. 3b. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.




*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 9-8 Visualización del transporte axonal.** *a-c*) Estas micrografías de video muestran la progresión de un organelo membranoso a lo largo de un axón ramificado. El cuerpo de la célula está lejos del campo hacia la parte superior izquierda, mientras que los extremos (conos de crecimiento, página 379) están fuera del campo hacia la parte inferior derecha. La posición del organelo está indicada por las puntas de flecha. El organelo que se está siguiendo (una vacuola autofágica) se mueve en dirección retrógrada a través del punto de ramificación y continúa moviéndose hacia el cuerpo de la célula. Bar, 10 μm.

FUENTE: Tomada de Peter J. Hollenbeck. *J Cell Biol* 1993;121:307, Fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

portarán por toda la longitud del axón (**FIGURA 9-7*a***). La carga no unida a la membrana, como los RNA, los ribosomas e incluso los elementos del citoesqueleto también se transportan a lo largo de esta gran extensión de citoplasma extendido.

Los diferentes materiales se mueven a ritmos distintos, y el transporte axonal más rápido se produce a velocidades de 5 μm por segundo. A este ritmo, una vesícula sináptica inmadura atraída por las proteínas motoras de tamaño nanométrico pueden viajar 0.4 metros en un solo día o aproximadamente de la mitad de la médula espinal hasta la punta del dedo. Se dice que las estructuras y los materiales que viajan desde el cuerpo celular hacia los terminales de una neurona se mueven en una dirección anterógrada. Otras estructuras, incluidas las vesículas endocíticas que se forman en las terminales de los axones y transportan factores reguladores de las células blanco, se mueven en la dirección opuesta, o retrógrada, desde la sinapsis hacia el cuerpo de la célula. La esclerosis lateral amiotrófica (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, se ha relacionado con varias enfermedades neurológicas.

Los axones están llenos de estructuras citoesqueléticas, incluidos haces de filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos interconectados de diversas maneras (figura 9-7*b,c*). Usando la videomicroscopía, los investigadores pueden seguir las vesículas individuales a medida que se mueven a lo largo de los microtúbulos de un axón, hacia o desde el cuerpo de la célula (**FIGURA 9-8**). Estos movimientos están mediados principalmente por los microtúbulos (figura 9-7*c*), que sirven como guía para una variedad de **proteínas motoras**. El estudio de las proteínas motoras se ha convertido en el centro de interés más importante en la biología celular y molecular, y se ha recopilado una gran cantidad de información sobre la naturaleza de estas moléculas y su mecanismo de acción, que son los temas de la siguiente sección.

**REPASO**

1. Describa tres funciones de los microtúbulos.

## 9.3 Proteínas motoras: las cinesinas y las dineínas

Las proteínas motoras de una célula convierten la energía química (almacenada en ATP) en energía mecánica, que se usa para generar fuerza, como cuando una célula muscular se contrae o para mover carga celular conectada al motor. Los tipos de cargamento celular que estas proteínas transportan comprenden vesículas, mitocondrias, lisosomas, cromosomas y otros filamentos del citoesqueleto. Una sola célula puede contener diferentes proteínas motoras, cada una presumiblemente especializada para una actividad distinta, como el movimiento de tipos particulares de carga en una región particular de la célula. Colectivamente, las proteínas motoras se pueden agrupar en tres superfamilias amplias: las cinesinas, las dineínas y las miosinas. Las cinesinas y las dineínas se mueven a lo largo de microtúbulos, mientras que las miosinas lo hacen a través de los filamentos de actina. No se conoce ninguna proteína motora que utilice pistas de filamentos intermedios. Este método no está destinado a proporcionar una guía direccional al motor.

### Las proteínas motoras que atraviesan el citoesqueleto microtubular

Las proteínas motoras se mueven unidireccionalmente a lo largo de su trayecto citoesquelético de una manera gradual, de un sitio de unión al siguiente. A medida que la proteína avanza, sufre una serie de cambios conformacionales que constituyen un ciclo mecánico. Los pasos del ciclo mecánico están acoplados a los del ciclo químico (o catalítico), que proporciona la energía necesaria para alimentar la actividad del motor (véase figura 9-61 para un ejemplo). Los pasos en el ciclo químico incluyen la unión de una molécula de ATP al motor, la hidrólisis de ATP, la liberación de los productos (ADP y Pi) del motor, y la unión de una nueva molécula de ATP. La unión e hidrólisis de una sola molécula de ATP en el sitio catalítico se utiliza para impulsar un golpe de potencia que hace que la cantidad de nanómetros siga su curso. A medida que la proteína motora se mueve a sitios sucesivos a lo largo del polímero citoesquelético, los ciclos mecánicos y químicos se repiten una y otra vez, tirando de la carga a distancias considerables. Tenga en cuenta que estamos describiendo motores de tamaño molecular que, a diferencia de las máquinas hechas por humanos, están muy influidos por su entorno. Por ejemplo, las proteínas motoras prácticamente no tienen impulso y están sujetas a una tremenda resistencia a la fricción por su ambiente viscoso. Como resultado, una proteína motora se detiene.

Comenzaremos por examinar la estructura molecular y las funciones de las cinesinas, que son los motores microtubulares más pequeños y mejor comprendidos.

## Cinesinas

En 1985 Ronald Vale y sus colegas aislaron una proteína motora del citoplasma de los axones gigantes de los calamares que usaban microtúbulos como su rastro. Llamaron a la proteína **cinesina**, que se encuentra sustancialmente en casi todas las células eucariotas. La molécula de cinesina descubierta en 1985, que se conoce como "cinesina convencional" o cinesina-1, es solo un miembro de una superfamilia de proteínas relacionadas, llamadas proteínas relacionadas con cinesina (**KRP**, *kinesin-related proteins*). Las KRP se clasifican en 14 familias diferentes (cinesina-1 a cinesina-14). En la siguiente discusión, el término *cinesina* se referirá a los miembros de la familia cinesina-1.

Cada molécula de cinesina-1 es un tetrámero construido a partir de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas (**FIGURA 9-9*a***). Una molécula de cinesina tiene varias partes, incluido un par de cabezas globulares que se unen a un microtúbulo y actúan como "máquinas" generadoras de fuerza que hidrolizan ATP. Cada cabeza (o dominio motor) está conectada a un cuello, un pedúnculo cilíndrico y una cola en forma de abanico que une la carga para ser transportada (figura 9-9*a*). Las porciones motoras de todos las KRP tienen secuencias de aminoácidos relacionadas, lo que refleja su común ascendencia evolutiva y su rol similar en el movimiento a lo largo de los microtúbulos. Por el contrario, las colas de las KRP tienen varias secuencias, lo que refleja el alcance de estas distancias. Se han identificado varias proteínas diferentes como adaptadores potenciales que vinculan KRP específicos y sus cargas. Sorprendentemente, los dominios motores de cinesinas son similares en estructura a la de las miosinas, a pesar de que las cinesinas son proteínas mucho más pequeñas y los dos tipos de motores funcionan a través de diferentes vías. Las cinesinas y las miosinas evolucionaron casi con certeza a partir de una proteína ancestral común presente en una célula eucariótica primitiva.

La actividad de las moléculas de cinesina purificadas pueden observarse en años de ensayo de motilidad *in vitro* [véase figura 9-9*c*) **y el video tutorial experimental "Microtúbulos de ensayo de deslizamiento"** para este capítulo]. En tal ensayo, la cinesina purificada se une a un cubreobjetos de vidrio, a continuación, los microtúbulos se agregan junto con los medios que contienen ATP. Debido a que las cinesinas están ancladas al vidrio, los microtúbulos se mueven en la dirección opuesta a la dirección a la que el motor da un paso. Cuando se usa cinesina-1 purificada en tal ensayo, las proteínas motoras se mueven a lo largo de los microtúbulos hacia su extremo más. Por tanto, se dice que la cinesina es motor microtubular dirigido al lado más orientado a los extremos. En un axón, donde todos los microtúbulos están orientados con su extremo menos hacia el cuerpo celular, la cinesina transporta cargamentos hacia las terminaciones sinápticas. El descubrimiento de la cinesina se discute en la "Vía experimental", que se puede encontrar en www.wiley.com/college/karp.

Una molécula de cinesina solo se mueve a lo largo de un solo protofilamento de un microtúbulo a una velocidad proporcional a la concentración de ATP (hasta una velocidad máxima de aproximadamente 1 micrómetro por segundo). A bajas concentraciones de ATP, las moléculas de cinesina viajan lo suficientemente lento como para observar que la proteína se mueve en pasos separados (figura 9-9*b*). Cada paso de la molécula tiene aproximadamente 8 nm de longitud, que también es la longitud de un dímero de tubulina en un protofilamento, y requiere la hidrólisis de una sola molécula de ATP. Los métodos utilizados para medir el tamaño del paso de la cinesina se describen en la sección 9.4: "Vía experimental: El tamaño del paso de la cinesina". Ahora se acepta generalmente que la cinesina se mueve mediante un mecanismo de "mano sobre mano" representado en la figura 9-9*b*) por la animación asociada. De acuerdo con este modelo, que es básicamente similar a una persona que sube por una cuerda, las dos cabezas se alternan para tomar la primera o segunda posición sin una rotación acompañante del pedúnculo y la carga en cada paso.

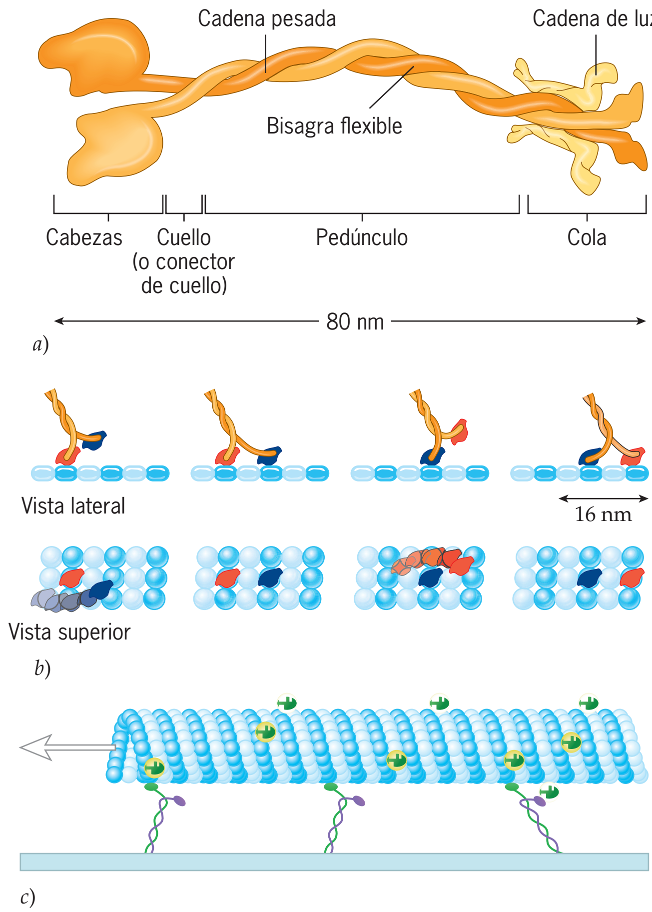



**FIGURA 9-9 Cinesina.** *a*) Estructura de una molécula de cinesina-1, que consiste en dos cadenas pesadas asociadas con los extremos globulares de las cadenas pesadas. El genoma humano codifica tres cadenas pesadas diferentes y cuatro cadenas ligeras diferentes para cinesina-1. Los cabezales generadores de fuerza se unen al microtúbulo y la cola se une a la carga que se transporta. Tiene una masa molecular de aproximadamente 380 kDa, miosina (músculo miosina, 520 kDa) y dineína (más de 1 000 kDa). *b*) Diagrama esquemático de una molécula de cinesina que se mueve a lo largo de una trayectoria microtubular. En el modelo alternativo de mano sobre mano que se muestra aquí, las dos cabezas llevan a cabo movimientos equivalentes pero alternos, no muy diferentes a los de una persona caminando por un jardín en un camino lineal de escalones. Al igual que al caminar, la cabeza (pierna) posterior se mueve 16 nm hacia adelante alternativamente en el lado izquierdo y derecho del pedúnculo (cuerpo). *c*) Esquema del ensayo de motilidad *in vitro* de cinesina. Las cinesinas se depositan en un cubreobjetos, luego se agregan microtúbulos con un marcador fluorescente (verde) al cubreobjetos y se observan con un microscopio. La actividad motora de las cinesinas hace que los microtúbulos se deslicen sobre el cubreobjetos.

El movimiento de las moléculas de cinesina, tanto *in vitro* como *in vivo*, es altamente **progresivo**, lo que significa que la proteína motora tiende a moverse a lo largo de un microtúbulo individual a distancias considerables (más de 1 μm) sin caerse. Una molécula de cinesina de dos cabezas puede realizarse en el microtúbulo en todo momento (figura 9-9*b*). Una proteína motora con esta capacidad está bien adaptada para el transporte independiente y de larga distancia de pequeños paquetes de carga.

Las dos cabezas de una molécula de cinesina se comportan de forma coordinada, de modo que siempre están presentes en diferentes etapas de sus ciclos químicos y mecánicos en un momento dado. Cuando una cabeza se une a los microtúbulos, el intercambio resultante y conformacional cambia en la zona del cuello adyacente de la proteína motora porque la otra cabeza avanza hacia el siguiente sitio de unión en el protofilamento. La cabeza que avanza hacia adelante probablemente encuentre su sitio de unión precisa en el protofilamento a través de una búsqueda rápida, difusional (aleatoria).

El microtúbulo no es simplemente una vía pasiva en estos eventos, sino que desempeña un papel activo en la estimulación de ciertos pasos en los ciclos mecánicos y químicos de la molécula de cinesina. Las cinesinas de solubilidad libre adoptan una conformación plegada, autoinhibida y requieren interacción con la carga y un microtúbulo para activarse.

Al igual que la cinesina-1, la mayoría de las KRP se mueven hacia el extremo positivo del microtúbulo al que están unidos. Sin embargo, una pequeña familia (llamada cinesina-14), que incluye la ampliamente estudiada proteína Ncd de Drosofila, se mueve en la dirección opuesta, es decir, hacia el extremo menos de la pista microtubular. Se podría esperar que las cabezas de las KRP más orientadas a los extremos más y las más orientadas a los extremos menos tengan una estructura diferente porque contienen los dominios motores catalíticos. Pero las cabezas de las dos proteínas son prácticamente indistinguibles. En cambio, las diferencias en el movimiento direccional se han remontado a las diferencias en las regiones adyacentes del cuello de las dos proteínas.

Cuando la cabeza de una molécula negativa de Ncd dirigida al extremo se une al cuello y acecha porciones de una molécula de cinesina-1, la proteína híbrida se mueve hacia el extremo positivo de la pista. Por tanto, aunque el híbrido tiene un dominio catalítico que normalmente se movería hacia el extremo negativo de un microtúbulo, siempre que esté unido al cuello de un motor de extremo positivo, se mueve en la dirección positiva.

Una tercera familia pequeña (cinesina-13) de proteínas parecidas a la cinesina es incapaz de moverse. Las KRP de este grupo se unen a cualquier extremo de un microtúbulo y provocan su despolimerización en lugar de moverse a lo largo de su longitud. Estas proteínas a menudo se denominan despolimerasas de microtúbulos.[1] El importante papel de estas y otras KRP durante la división celular se explorará en el capítulo 14.

[1] Los miembros de la familia cinesina-8 también actúan como despolimerasas, pero alcanzan la punta de los microtúbulos por un movimiento progresivo.

**TRANSPORTE DE ORGANELO MEDIADO POR CINESINAS** Vimos en el capítulo 8 cómo las vesículas se mueven de un compartimento membranoso, como el complejo de Golgi, a otro, como un lisosoma. Las rutas seguidas por vesículas citoplásmicas y organelos están definidas en gran medida por los microtúbulos (véase figura 9-1), y los miembros de la superfamilia de cinesina están fuertemente implicados como agentes generadores de fuerza que impulsan el movimiento de esta carga limitada a la membrana. En la mayoría de las células, como en los axones, los microtúbulos se alinean con sus extremos más apuntando lejos del centro de la célula. Por tanto, los miembros de la superfamilia de cinesina tienden a mover vesículas y organelos (p. ej., peroxisomas y mitocondrias) en una dirección hacia la membrana plasmática de la célula. Esto se ilustra en las micrografías de la **FIGURA 9-10**. El par de micrografías etiquetadas como *a* y *c* muestra una célula que se aisló de un embrión de ratón normal de 9.5 días y se tiñó para revelar la ubicación de sus microtúbulos (verde) y las mitocondrias (naranja). El par de micrografías etiquetadas como banda muestra una célula que se aisló de un embrión de ratón de 9.5 días que carecía de ambas copias del gen que codifica la cadena pesada de cinesina KIF5B (un miembro de la familia cinesina-1). Las mitocondrias de la célula deficiente en KIF5B están ausentes de las regiones periféricas de la célula, como cabría esperar si esta cinesina dirigida más al final es responsable del movimiento hacia afuera de los organelos membranosos (véase también figura 9-11*c*).

## Dineína citoplásmica

El primer motor asociado a microtúbulos fue descubierto en 1963 como la proteína responsable del movimiento de cilios y flagelos. La proteína se denominó **dineína**. La existencia de formas citoplásmicas se sospechó casi de inmediato, pero tomó más de 20 años antes de que una proteína similar se purificara y caracterizase a partir de tejido cerebral de mamíferos y se llamara **dineína citoplásmica**. Considerando que cada uno de nosotros tiene mu-

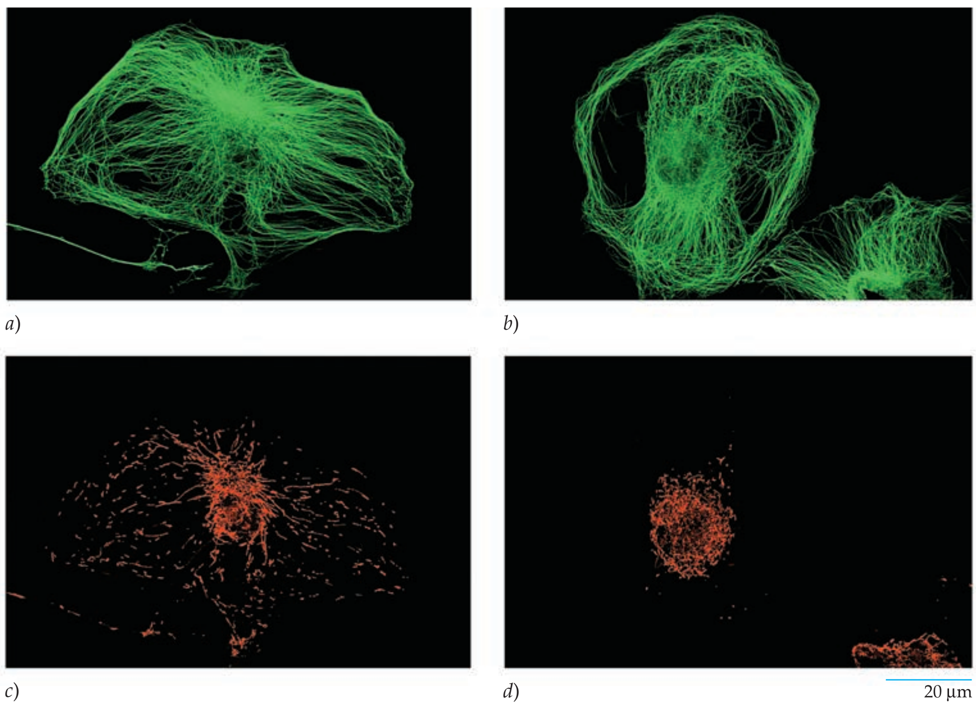



**FIGURA 9-10 Alteración en el fenotipo de una célula que carece de un miembro de la superfamilia de cinesina.** *a,c*) Célula de control de los tejidos extraembrionarios de un embrión de ratón normal de 9.5 días teñido en a para microtúbulos (verde) y en c para mitocondrias (rojo). Una fracción significativa de las mitocondrias de la célula se encuentra a lo largo de los microtúbulos en las regiones periféricas de la célula. *b,d*) Una célula correspondiente obtenida de un embrión que carecía de ambas copias del gen que codifica KIF5B, que es una de las tres isoformas de cinesina-1 en ratones y seres humanos. Todas las mitocondrias están agrupadas en la región central de la célula, lo que sugiere que KIF5B es responsable de transportar las mitocondrias en una dirección externa.

FUENTE: De Yosuke Tanaka, *et al.* Cortesía de Nobutaka Hirokawa. *Cell* 1998;93:1150, con permiso de Elsevier.

chas cinesinas diferentes (y miosinas), cada una adaptada para funciones específicas, podemos administrarla solo con dos dineínas **citoplásmicas**, una de las cuales parece ser responsable de la mayoría de las operaciones de transporte.

La **dineína citoplásmica** es una proteína enorme (masa molecular de aproximadamente 1.5 millones de daltones) compuesta de dos cadenas pesadas idénticas y una variedad de cadenas intermedias y ligeras (**FIGURA 9-11*a***). Cada cadena pesada de dineína consiste en una gran cabeza globular con una proyección alargada (pedúnculo). La cabeza de dineína, que es un orden de magnitud mayor que una cabeza de cinesina, actúa como un motor de generación de fuerza. Cada pedúnculo contiene el importante sitio de unión de microtúbulos situado en su punta. La proyección más larga, conocida como el pedúnculo (o cola), une las cadenas intermedias y ligeras, cuyas funciones no están bien definidas. Los análisis estructurales indican que el dominio motor de dineína consiste en una serie de módulos distintos organizados en forma de rueda (véase figura 9-31), lo que hace que sea fundamentalmente diferente tanto en la arquitectura como en el modo de operación de la cinesina y la miosina.

Los ensayos de motilidad *in vitro* indican que la dineína citoplásmica se mueve de forma progresiva a lo largo de un microtúbulo hacia el extremo menos positivo del polímero, opuesto al de la mayoría de las cinesinas (figura 9-11*b*). La dineína citoplásmica está presente en todo el reino animal, así como en hongos y protistas, pero parece haberse perdido durante la evolución de las plantas superiores, que en su lugar tienen una matriz expandida de cinesinas menos dirigidas a los extremos (miembros cinesina-14). Un cuerpo de evidencia sugiere al menos dos papeles bien estudiados para la dineína citoplásmica:

1. Como un agente generador de fuerza para posicionar el huso y mover los cromosomas durante la mitosis (discutido en capítulo 14).
2. Como un motor microtubular negativo dirigido a los extremos con un papel en el posicionamiento del centrosoma y el complejo de Golgi y en el movimiento de organelos, vesículas y partículas a través del citoplasma.

En las células nerviosas, la dineína citoplásmica ha sido implicada en el movimiento retrógrado de los organelos membranosos y el movimiento anterógrado de los microtúbulos. En fibroblastos y otras células no neurales, se piensa que la dineína citoplásmica transporta organelos membranosos desde ubicaciones periféricas hacia el centro de la célula (figura 9-11*c*). La carga dirigida por la dineína incluye endosomas y lisosomas, vesículas derivadas de ER dirigidas hacia el complejo de Golgi, moléculas de RNA y el virus HIV, que se transporta al núcleo de una célula infectada. La dineína citoplásmica no interactúa directamente con la carga limitada a la membrana, sino que requiere un adaptador intermedio, con mayor frecuencia la proteína multisubunidad dinactina. La dinactina también vuelve a regular la actividad de la dineína al aumentar la capacidad de procesamiento de la dineína.

De acuerdo con el modelo simplificado que se muestra en la figura 9-11*c*), las cinesinas y la dineína citoplásmica mueven materiales similares en direcciones opuestas sobre la misma red de rieles. Como se indica en la figura 9-11*b*), los organelos individua-

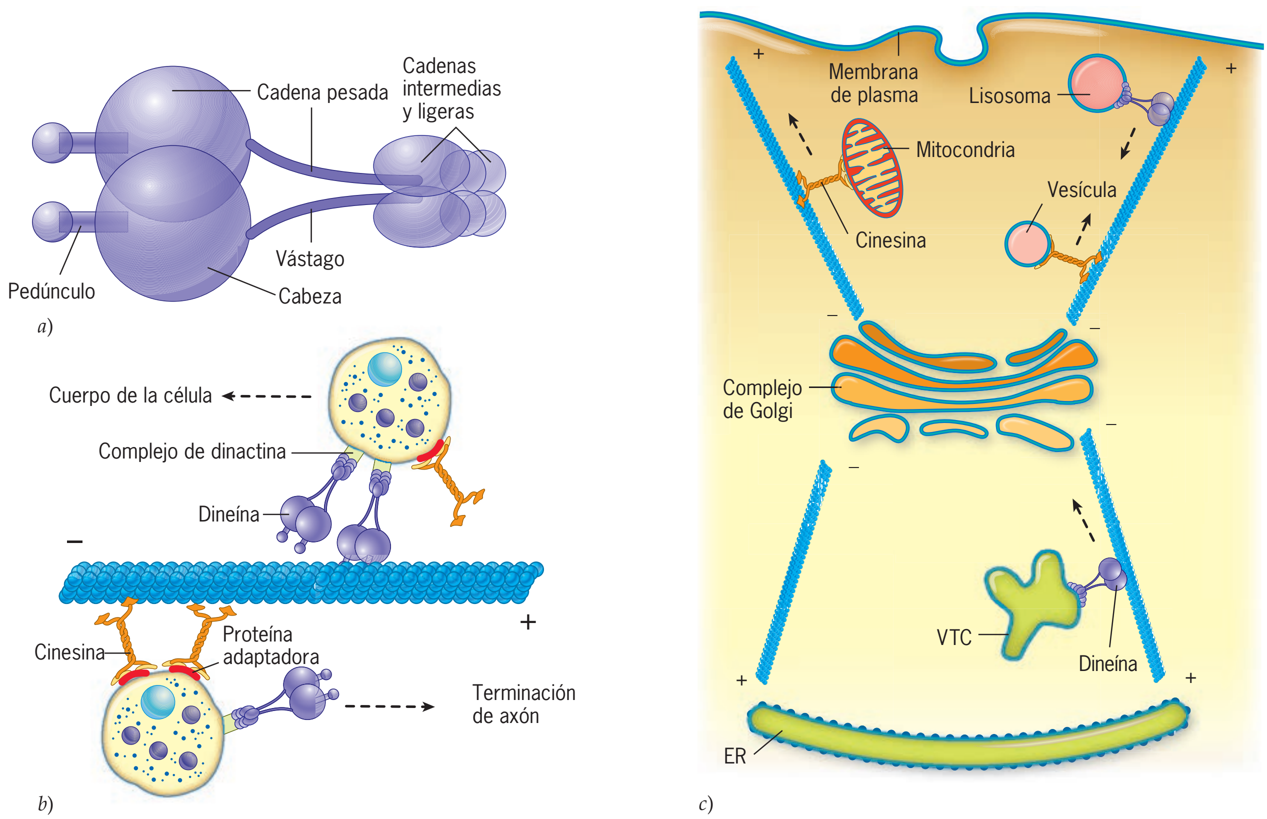



**FIGURA 9-11 Dineína citoplásmica y transporte de organelos por proteínas motoras de seguimiento de microtúbulos.** *a*) Estructura de una molécula de dineína citoplásmica, que contiene dos cadenas pesadas de dineína y varias cadenas intermedias y ligeras más pequeñas en la base de la molécula. Cada cadena pesada de dineína contiene una cabeza grande, globular, generadora de fuerza, un pedúnculo sobresaliente que contiene un sitio de unión para el microtúbulo y un pedúnculo. *b*) Diagrama esquemático de dos vesículas que se mueven en direcciones opuestas a lo largo del mismo microtúbulo, una potenciada por cinesina que se mueve hacia el extremo más de la pista y la otra por dineína citoplásmica que se mueve hacia el extremo menos de la pista. En el modelo que se muestra aquí, cada vesícula contiene ambos tipos de proteínas motoras, pero las moléculas de cinesina se inactivan en la vesícula superior y las moléculas de dineína se inactivan en la vesícula inferior. Ambas proteínas motoras están unidas a la membrana de la vesícula por un intermediario: la cinesina se puede unir a las vesículas mediante una variedad de proteínas de membrana integrales y periféricas, y la dineína mediante un complejo de proteína soluble llamado dinactina. c) Ilustración esquemática del transporte de vesículas mediado por cinesina, dineína, grupos vesiculares tubulares (VTC, *vesicular-tubular clusters*) y organelos en una célula cultivada no polarizada.

les pueden unir cinesina y dineína simultáneamente, lo que los dota de la capacidad de moverse en direcciones opuestas dependiendo de las condiciones. No está claro cómo se regula la actividad de los motores opuestos, pero las observaciones *in vitro* han demostrado que dos motores opuestos pueden participar en un tipo de tira y afloja, haciendo que el objeto al que están unidos se mueva hacia adelante y hacia atrás a lo largo del microtúbulo. Como se analiza en la figura 9-44, la miosina también puede estar presente en algunos de estos organelos, lo que proporciona la oportunidad para que estos se muevan a lo largo de los filamentos de actina, así como de los microtúbulos.

**REPASO**

1. Contraste los roles evidentes de la cinesina y la dineína citoplásmica en el transporte axonal.



# 9.4 VÍA EXPERIMENTAL

## El tamaño del paso de la cinesina

Las proteínas motoras son capaces de generar fuerza mecánica al someterse a una serie de cambios conformacionales que hacen que el motor tome medidas a lo largo del sustrato citoesquelético subyacente (filamentos de actina para motores de miosina o microtúbulos para motores de cinesina). ¿Cómo son estos cambios conformacionales? La suposición más simple es que a medida que el motor se desplace a lo largo del microtúbulo o polímero de actina, podría aumentar la distancia de un solo dímero de tubulina o subunidad de actina cada vez que se hidroliza un ATP; de hecho, así fue como se esbozaron estos pasos en dibujos poco después de que se descubrieran las proteínas motoras. Pero las consideraciones teóricas mostraron que era potencialmente posible que un motor tomara medidas mucho más grandes.[1] Los intentos iniciales para estimar el tamaño de estos pasos usaron ensayos de motilidad *in vitro* para medir la velocidad del movimiento motor. Estos ensayos se realizan recubriendo un cubreobjetos con miosina o cinesina, añadiendo filamentos de actina o microtúbulos junto con una fuente de ATP en el tampón, y luego visualizando el cubreobjetos con un microscopio. La actividad motora da como resultado que la actina o los microtúbulos se desplacen a través del campo de visión a la misma velocidad con la cual el motor se traslada a lo largo del filamento (figura 9-9). Combinando tales ensayos de motilidad *in vitro* con ensayos para la tasa de hidrólisis de ATP llevados a cabo en condiciones experimentales similares, se puede estimar qué tan lejos se mueve un motor por ATP hidrolizado. Los intentos de esta medición dieron como resultado una sorprendente variedad de estimaciones para el tamaño de escalonamiento. Por ejemplo, en el caso de la miosina, Uyeda y Spudich en la Universidad de Stanford obtuvieron tamaños de pasos consistentes con miosina pasando de un monómero de actina al siguiente a lo largo del filamento,[2] mientras que el grupo de Toshio Yanagida trabajando en la Universidad de Osaka estimó que el tamaño era 10 veces más grande.[3] Una complicación con este enfoque es que asume un acoplamiento perfecto entre la hidrólisis de ATP y el escalonamiento, de modo que el número de pasos tomados en un periodo dado se puede calcular a partir de la tasa de hidrólisis de ATP.

Los tamaños de paso muy grandes estimados a partir de algunos de los ensayos *in vitro* se tomaron como evidencia de que el acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y la etapa mecánica podría ser mucho más flexible de lo que se pensó inicialmente. Por tanto, el debate sobre el tamaño del paso planteó serias dudas sobre cómo se utilizó la hidrólisis de nucleótidos para generar movimiento. La resolución de la pregunta sobre el tamaño del paso requirió una forma de medir los movimientos de una proteína en una escala de tamaño de unos pocos nanómetros.

La primera medición directa de un motor en pasos individuales fue un análisis del paso de la cinesina realizado por Karel Svoboda y Steve Block en el Instituto Rowland[4] y aprovechó la tecnología de trampa óptica que Block había inventado. Aunque el trabajo anterior sobre el tamaño de los pasos se había enfocado principalmente en la miosina, el grupo de Block decidió estudiar el avance de la cinesina, en lugar de la miosina, por varias razones. En primer lugar, era menos probable que la cinesina se alejara del sustrato de la miosina porque gasta más de su ciclo unido, eliminando así posibles problemas con el motor al azar durante la medición. En segundo lugar, los microtúbulos son más rígidos que la actina, por lo que debería haber menos movimiento del sustrato, lo que les permite concentrarse en el movimiento del motor. Finalmente, la cinesina es capaz de mover cuentas como un solo motor, lo que posibilita que un cordón adjunto sirva como un “mango” para sostener la cinesina y colocarla sobre un microtúbulo. Esta elección consciente de estudiar el paso de la cinesina ilustra un punto importante en el diseño experimental: cuando se prueba una hipótesis controvertida, vale la pena utilizar el sistema modelo más manejable disponible para que los resultados sean lo menos ambiguos posible.

Una vez que se prepararon las pequeñas piezas que tenían las moléculas de cinesina unidas, estas se mantuvieron separadas en la trampa láser mientras que la cinesina unida tomó los pasos a lo largo del microtúbulo. Sostener el cordón en una trampa láser resultó ser extremadamente importante porque redujo el movimiento browniano aleatorio del cordón que de otro modo habría oscurecido el movimiento de escalonamiento subyacente. El cordón también hizo que el movimiento de la cinesina fuera fácil de observar, porque la luz del láser estaba muy dispersa por el cordón. Esto creó una señal brillante que podría ser observada y medida. Las cinesinas individuales, sin un cordón adherido, no serían visibles en un microscopio. Así que el cordón proporcionaba dos características: hacía que la actividad de cinesina fuera visible, y proporcionaba un mango para manipular y sostener el motor usando una trampa óptica.

Una pregunta obvia es si la física de la luz pone un límite fundamental a la capacidad de observar pequeños movimientos de pasos. La distancia entre los dímeros de tubulina adyacentes en un microtúbulo (véase figura 9-3*d*) es de 8 nm, muy por debajo del límite de resolución de la microscopía óptica que, en condiciones ideales de formación de imágenes, es de aproximadamente 200 nm. ¿Significa esto que los movimientos a escala nanométrica no se pueden resolver? ¡No! Como se discute en el capítulo 18, la resolución solo limita cuán cerca pueden estar dos objetos antes de que no podamos diferenciarlos en el microscopio. El límite de resolución no afecta la precisión con la que podemos determinar la posición de un objeto. En cambio, lo que importa es cuánta luz se puede recoger del objeto a través de la lente del objetivo del microscopio. Si hay muy poca luz, la imagen será ruidosa, y este ruido dominará cualquier medición de posición. Pero con un cordón de sílice iluminado por un láser, la luz podía elevarse hasta un nivel lo suficientemente alto como para que apenas hubiera ruido en la imagen.

En los experimentos de Svoboda *et al.* se midió la posición del cordón usando interferometría láser. En este método, un rayo láser se dividió en dos haces paralelos de luz polarizada que se polarizaron en diferentes direcciones. Después de que los dos haces fueron recogidos por el objetivo, se recombinaron para regenerar el rayo láser original. Cuando un cordón se movió frente a uno de los dos haces, cambió el haz recombinado de una

(*continúa*)

manera que podría convertirse en la posición del talón utilizando componentes electrónicos sensibles. Como se muestra en la **FIGURA 1**, cuando el motor comenzó a halar, la pequeña pieza se movió, pero en lugar de moverse suavemente, hizo saltos repentinos de una posición a otra. El tamaño promedio de estos saltos fue de 8 nm, el espaciado exacto entre los dímeros de tubulina a lo largo de un protofilamento de microtúbulos (véase figura 9-3*d*).

En el primer informe, estos pasos fueron difíciles de entender sobre el ruido de fondo en la medición, y la medición de los pasos requirió un cuidadoso análisis matemático de la curva de desplazamiento en función del tiempo. Los métodos más recientes, sin embargo, han reducido el ruido y hacen que los pasos sean aún más claros. Ahora es posible visualizar motores de cinesina individuales sin tener que unirlos a un cordón usando moléculas fluorescentes unidas a la proteína.[5] La capacidad de visualizar un solo fluoróforo y medir su posición con precisión nanométrica ha sido el resultado de mejoras en la sensibilidad de la cámara y ha resultado en una mayor comprensión de los cambios conformacionales que realiza la cinesina a medida que avanza.

El análisis de cinesina con una sola molécula fue fundamental para mostrar que un motor de dos cabezas se mueve mediante un mecanismo de mano sobre mano, como se ilustra en la figura 9-9*b*). En el modelo de mano sobre mano, las dos cabezas tomarían turnos para estar delante mientras el motor dimérico caminaba a lo largo del microtúbulo. Este modo de movimiento se asemejaría a un humano caminando por una acera, excepto por una diferencia estructural importante: los humanos tenemos un eje de simetría bilateral, de modo que nuestro pie izquierdo es la imagen especular de nuestro pie derecho, mientras que en las proteínas de motor las dos mitades son idénticas y, en estructuras cristalinas, los dominios motores están orientados 120 grados entre sí, cerca de la simetría rotacional ideal de 180 grados esperada para un complejo homodimérico.[6] Suponiendo que ambos dominios motores experimentan movimientos idénticos cuando dan un paso, el motor dimérico tendría que girar 180 grados con cada paso, siempre en la misma dirección, por tanto, se predijo que el mecanismo de mano sobre mano daría como resultado el dímero como un todo girando alrededor. Se había propuesto un tipo de movimiento alternativo en el que una cabeza siempre se mantenía al frente y la otra siempre se quedaba atrás, como una persona cojeando. Este modelo, conocido como el mecanismo de gusano de pulgada, no requeriría los grandes movimientos de rotación que el modelo de mano sobre mano parecía requerir.

Estos dos modelos fueron probados en experimentos llevados a cabo por Gelles y colaboradores en la Universidad Brandeis, quienes midieron la rotación de la cola de cinesina cuando el motor dio un paso al frente.[7] Al anclar la cola de cinesina a un tobogán y observar el movimiento de un microtúbulo libre cuando la cinesina lo pisó, fue posible demostrar que la cola no mostraba nada parecido a la gran rotación persistente que se esperaba. Basándose en este resultado, Gelles y sus colaboradores llegaron a la conclusión de que la cinesina debe usar un mecanismo similar a un gusano para tomar medidas. Para investigar esta cuestión más directamente, Yildiz y Selvin[8] unieron una molécula fluorescente a uno de los dos dominios de la cabeza del motor: la parte de la proteína que realmente entra en contacto con el microtúbulo. En contraste con los movimientos de un cordón o fluoróforo unido a la cola del motor, que mostró pasos de 8 nm, las cabezas individuales mostraron pasos de 17 nm, que es el resultado esperado si el motor camina con un movimiento de mano sobre mano (figura 9-9*b*), pero que no es consistente con un mecanismo de gusano.

Exactamente como las cabezas son capaces de dar pasos mano a mano sin hacer que el dímero gire se convierte en una cuestión de cambio de conformación detallada alrededor de los vinculadores que unen las cabezas a las colas. Claramente, las dos cabezas no deben moverse de la misma manera, porque si lo hicieran, todo el dímero tendría que girar. Si las dos cabezas experimentan diferentes cambios conformacionales a medida que toman sus respectivos pasos, entonces se podría predecir que la cinética de paso por las dos cabezas podría ser ligeramente diferente. De hecho, las mediciones cuidadosas a nivel de una sola molécula han confirmado de modo dramático esta predicción al mostrar que las dos cabezas se mueven con una sincronización reproducible diferente, de modo que los pasos pares toman un tiempo diferente que los pasos impares.[9] Tal medición de diferentes cinéticas dentro de un motor dimérico habría sido absolutamente imposible mediante mediciones masivas e ilustraría el poder del análisis de una sola molécula para entender la mecánica del motor.

Estas medidas de precisión del movimiento de proteínas de motor único durante los últimos 20 años han acercado dramáticamente el campo de la biología celular al campo de la física y han brindado apoyo experimental directo a los diagramas animados que ilustran la visión conceptual de cómo se mueven las proteínas motoras.

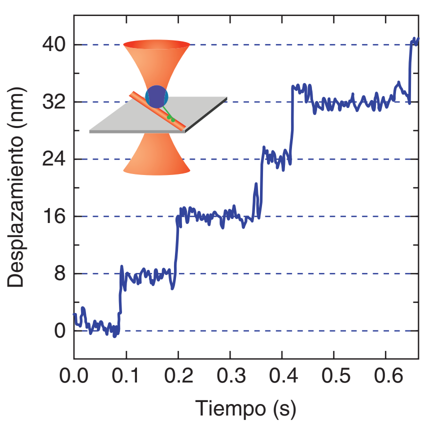



**FIGURA 1 Pasos sencillos de la cinesina mientras camina a lo largo del microtúbulo.** El desplazamiento desde la posición inicial aumenta a medida que el motor arrastra el talón. Pero en lugar de un desplazamiento que aumenta continuamente, salta en incrementos de 8 nm, que representan el paso de la cinesina de un dímero de tubulina al siguiente a lo largo del microtúbulo.

FUENTE: Cortesía del Dr. Steven Block, Universidad de Stanford.

## Referencias


1. Vale R. D., Oosawa F. Protein motors and Maxwell's demons: does mechanochemical transduction involve a thermal ratchet? *Adv Biophys* 1990;26:97-134.
2. Uyeda T. Q., Kron S. J., Spudich J. A. Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy mero myosin. *J Mol Biol* 1990;214:699-710.
3. Harada Y., Sakurada K., Aoki T, Thomas D. D., Yanagida T. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by *in vitro* movement assays. *J Mol Biol* 1990; 216:49-68.
4. Svoboda K., Schmidt CF, Schnapp B. J., Block S. M. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 1993;385:721-727.
5. Vale R. D., Funatsu T., Pierce D. W., Romberg L., Harada Y, Yanagida T. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* 1996;380:451-453.
6. Kozielski F., Sack S., Marx A., Thormaehlen M, Schoenbrunn E., Biou V, Thompson A, Mandelkow EM, Mandelkow E. The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell* 1997;91:985-994.
7. Hua W., Chung J., Gelles J. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measure ments. *Science* 2002;295:844-848.
8. Yildiz A., Tomishige M., Vale RD, Selvin PR. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 2004;303:676-678.
9. Fehr A. N., Gutierrez-Medina B., Asbury C. L., Block S. M. On the origin of kinesin limping. *Biophys J* 2009;97:1663-1670.

# 9.5 Centros organizadores de microtúbulos (MTOC)

La función de un microtúbulo dentro de una célula viva depende de su ubicación y orientación, lo que hace que sea importante entender por qué un microtúbulo se ensambla en un lugar y no en otro. Cuando se estudia *in vitro*, el ensamblaje de los microtúbulos de los dímeros de alfabetatubulina ocurre en dos fases distintas: una fase lenta de nucleación, en la que inicialmente se forma una pequeña porción del microtúbulo y una fase de elongación mucho más rápida. A diferencia del caso *in vitro*, la nucleación de los microtúbulos se produce rápidamente dentro de una célula, donde se produce en asociación con una variedad de estructuras especializadas llamadas **centros organizadores de microtúbulos** (o **MTOC**). El MTOC mejor estudiado es el centrosoma.

## Centrosomas

En las células animales, los microtúbulos del citoesqueleto son típicamente nucleados por el **centrosoma**, una estructura compleja que contiene dos **centriolos** en forma de barril rodeados por **material pericentriolar** (**PCM**, *pericentriolar material*) amorfo y electrodenso (**FIGURA 9-12*a,b***). Los centriolos son estructuras cilíndricas de aproximadamente 0.2 μm de diámetro y en general dos veces más largas. Los centriolos contienen nueve cuchillas espaciadas de modo uniforme, cada una de las cuales contiene tres microtúbulos, designados túbulos A, B y C. Solo el túbulo A es un microtúbulo completo (figura 9-12*a,b*). Los nueve túbulos A están conectados a un centro central con nueve radios llamados rueda de carro. La simetría de nueve pliegues del centriolo es el resultado de la estructura de la proteína SAS-6, que se autoensambla en un disco simétrico de nueve veces que forma el núcleo de la rueda de carro. Los nuevos centriolos típicamente se forman adyacentes y en ángulos rectos con los centriolos preexistentes (figura 9-12*a,c*). Este proceso de duplicación de centriolos significa que la mayoría de las células contienen un par de centriolos conectados en los que un centriolo, denominado madre, tiene al menos un ciclo celular más antiguo que el otro, que se denomina hija. Los centriolos hijas inicialmente se forman en ángulo recto con el centriolo madre, pero esta relación espacial precisa se pierde con posterioridad. Más discusión sobre la duplicación del centriolo se encontrará en el capítulo 14. Los centriolos reclutan PCM para formar un nuevo centrosoma en el cual estos están incrustados en una nube de PCM (figura 9-12*d*). Como se analiza

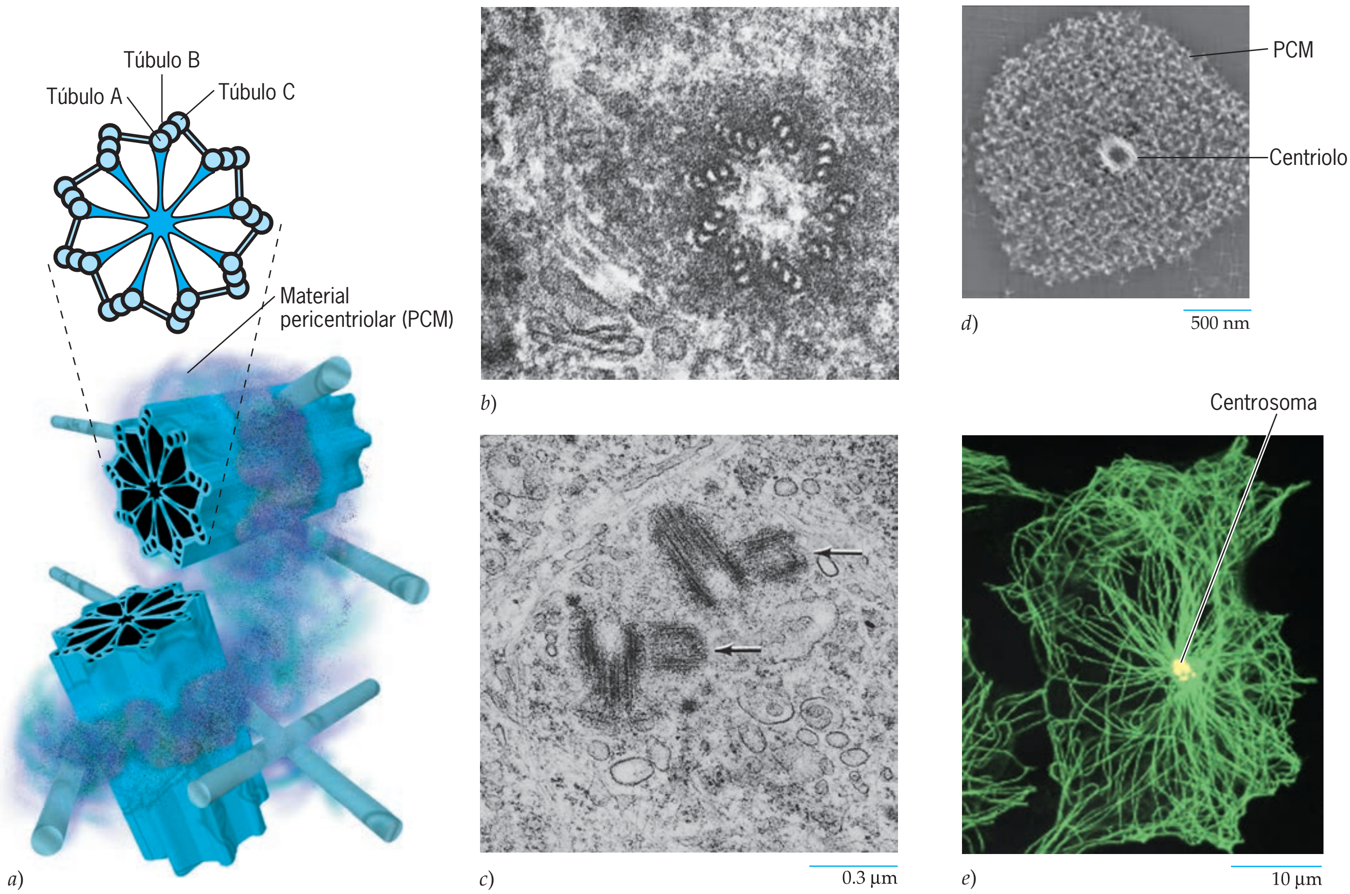



**FIGURA 9-12 El centrosoma.** *a*) Diagrama esquemático de un centrosoma que muestra los centriolos emparejados; el material pericentriolar circundante (PCM); y los microtúbulos que emanan del PCM, donde se produce la nucleación. *b*) Micrografía electrónica de una sección transversal de un centriolo que muestra la disposición de molinete de las nueve fibrillas periféricas, cada una de las cuales consiste en un microtúbulo completo y dos microtúbulos incompletos. *c*) Microfotografía electrónica que muestra dos pares de centriolos. Cada par consiste en un centriolo parental más largo y un centriolo secundario más pequeño (flecha), que está experimentando un alargamiento en esta fase del ciclo celular (discutido en la sección 14.2). *d*) Reconstrucción micrográfica de electrones de un centrosoma extraído con yoduro de potasio 1.0 M, que muestra que el PCM contiene una red fibrosa poco organizada. e) Micrografía de fluorescencia de una célula de mamífero cultivada que muestra el centrosoma (teñido de amarillo por un anticuerpo contra una proteína centrosomal) en el centro de una extensa red microtubular.

FUENTE: *a*) S. J. Doxsey, *et al*. *Cell* 1994;76:643, con permiso de Cell Press. Cell by Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de diario a través del centro de autorización de derechos de autor; *b*) Cortesía de BR Brinkley; *c*) De Jerome B Rattner y Stephanie G Phillips, *J Cell Biol* 1973;57:363, fig. 4. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *d*) De Bradely J Schnackenberg, *et al*. Cortesía de Robert E Palazzo, *Proc Nat'l Acad Sci* USA 1998;95:9298. © 1998 National Academy of Sciences, USA.; *e*) de Toshiro Ohta, *et al*. *J Cell Biol* 2002;156:88, Fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de Ryoko Kuriyama.

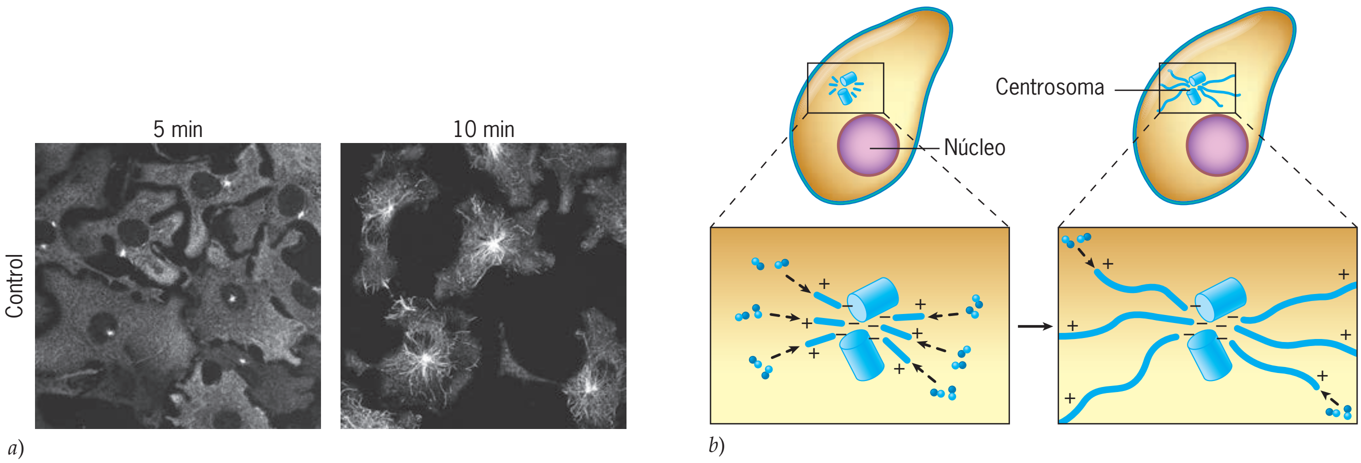



**FIGURA 9-13 Nucleación de microtúbulos en el centrosoma.** Las células MKN-1 humanas se trataron con nocodazol para despolimerizar microtúbulos. Luego se lavó el fármaco para permitir que los microtúbulos volvieran a crecer. Las imágenes muestran una microscopía de fluorescencia de células teñidas con anticuerpos que reconocen microtúbulos a los 5 y 10 después del lavado con nocodazol. En el punto de tiempo de cinco minutos, se puede ver los microtúbulos comenzar a crecer desde el mismo punto en la célula; este es el centrosoma.

FUENTE: De Fumoto K, Kadono M, Izumi N, Kikuchi A. El axón se localiza en el centrosoma y participa en la nucleación de microtúbulos. *EMBO* 2009;(10):606-13.

a continuación, el centrosoma es el principal sitio de iniciación de microtúbulos en células animales y, por lo general, permanece en el centro de la red microtubular de la célula (figura 9-12*e*).

La **FIGURA 9-13*a*)** muestra un experimento temprano que demuestra el papel del centrosoma en la iniciación y organización del citoesqueleto microtubular. Los microtúbulos de una célula animal cultivada se despolimerizaron primero incubando las células en colcemid, un fármaco que se une a las subunidades de tubulina y bloquea su uso por la célula. Luego se controló el reensamblaje de los microtúbulos mediante la eliminación de la sustancia química, la fijación de las células en diversos intervalos de tiempo y el tratamiento de las células fijadas con anticuerpos fluorescentes antitubulina. A los pocos minutos de la eliminación de las condiciones de inhibición, se observan una o dos manchas fluorescentes brillantes en el citoplasma de cada célula. Después de 15 o 30 minutos (figura 9-13*a*), el número de filamentos marcados que irradian fuera de estos focos aumenta dramáticamente. Cuando estas mismas células se seccionan y se examinan en el microscopio electrónico, se descubre que los microtúbulos recién formados irradian hacia fuera desde un centrosoma. Un examen detallado muestra que los microtúbulos en realidad no penetran en el centrosoma y hacen contacto con los centriolos, sino que terminan en la PCM densa que reside en la periferia del centrosoma. Es este material el que inicia la formación de microtúbulos (véase **FIGURA 9-14*c***).

Debido a que los centrosomas son sitios de nucleación de microtúbulos, los del citoesqueleto están todos polarizados de la misma manera: el extremo menos se asocia con el centrosoma y el extremo más (o crecimiento) está situado en la punta opuesta (figura 9-13*b*). La fracción de microtúbulos que permanece asociada con el centrosoma es muy variable de un tipo de célula a otro. El centrosoma de una célula no polarizada (p. ej., un fibroblasto) está típicamente situado cerca del centro de la célula y tiende a permanecer asociado con los extremos negativos de una gran cantidad de microtúbulos (como en la figura 9-12*e*). Por el contrario, muchos de los microtúbulos en una célula epitelial polarizada están anclados por sus extremos negativos en sitios dispersos cerca del extremo apical de la célula a medida que sus extremos más se extienden hacia la superficie basal de la célula (figura 9-1). Del mismo modo, el axón de una célula nerviosa contiene un gran número de microtúbulos que no tienen asociación con el centrosoma, que se encuentra en el cuerpo celular de la neurona. Se cree que muchos de estos microtúbulos axónicos se forman en conjunción con el centrosoma, pero luego se separan del MTOC y se transportan al axón mediante proteínas motoras. Ciertas células animales, incluidos los ovocitos de ratón, carecen por completo de centrosomas, pero aún son capaces de formar estructuras microtubulares complejas, como el huso meiótico (como se discutió en el capítulo 14). Los pacientes humanos con defectos genéticos en las proteínas asociadas al centrosoma muestran microcefalia, una reducción en el tamaño del cerebro, presumiblemente porque la proliferación y migración neuronal son en particular sensibles a las reducciones en la función del centrosoma.

## Cuerpos basales y otros MTOC

Los centrosomas no son los únicos MTOC en las células. Los microtúbulos externos en un cilio o flagelo se generan como excrecencias de los microtúbulos en una estructura llamada **cuerpo basal**, que reside en la base del cilio o flagelo (véase figura 9-28). Los cuerpos basales son idénticos en estructura a los centriolos, y de hecho, los cuerpos basales pueden convertirse en centriolos y viceversa. Por ejemplo, el cuerpo basal que da lugar al flagelo de un espermatozoide se deriva de un centriolo que había sido parte del huso meiótico de los espermatocitos del que surgieron los espermatozoides. Por el contrario, el cuerpo basal del esperma normalmente se convierte en un centriolo durante la primera división mitótica del óvulo fertilizado. Las células vegetales carecen de centrosomas y centriolos, o de cualquier otro tipo de MTOC obvio. En cambio, los microtúbulos en una célula vegetal se nuclean alrededor de la superficie del núcleo y ampliamente a lo largo de la corteza (véase **FIGURA 9-15**).

## Nucleación de microtúbulos

Independientemente de su apariencia diversa, todos los MTOC desempeñan funciones similares en todas las células: controlan la cantidad de microtúbulos, su polaridad, la cantidad de protofilamentos que forman sus paredes y el tiempo y la ubicación de su ensamblaje. Además, todos los MTOC comparten un componente de proteína común, un tipo de tubulina llamado **gammatubulina**, que se descubrió por primera vez a finales de la década de 1980 por Berl Oakley y sus colaboradores utilizando pantallas genéticas en el hongo *Aspergillus*. A diferencia de las alfa y betatubulinas, que constituyen aproximadamente 2.5% de la proteína de una célula no celular, la gammatubulina constituye solo alrededor del 0.005% de la proteína total de la célula. Los anticuerpos fluo-

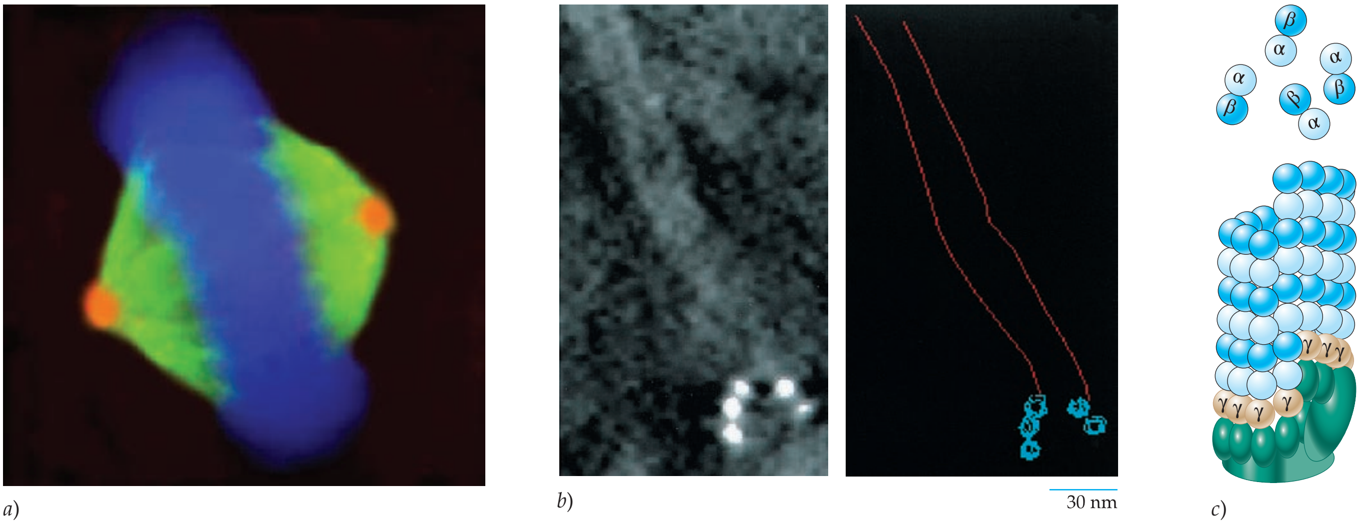



**FIGURA 9-14 El papel de la gammatubulina en la función del centrosoma.** *a*) La imagen muestra un huso mitótico en una célula UsOS humana teñida para gammatubulina (naranja), tubulina (verde) y DNA (azul). *b*) Una reconstrucción basada en micrografías electrónicas de una porción de un centrosoma que había sido incubado con tubulina purificada *in vitro* y luego marcado con anticuerpos contra gammatubulina. Los anticuerpos se unieron a partículas de oro para hacerlas visibles (como puntos blancos) en la reconstrucción. Durante la incubación con tubulina, el centrosoma sirvió como un MTOC para nuclear microtúbulos cuyos extremos negativos se ven etiquetados con grupos de oro, que a menudo están dispuestos en semicírculos o anillos. El dibujo adjunto muestra el contorno del microtúbulo visto en la reconstrucción. *c*) Un modelo para la función de la gammatubulina durante el ensamblaje de microtúbulos. La nucleación comienza cuando los dímeros de alfa y betatubulina se unen a un anillo abierto de moléculas de gammatubulina (marrón), que se mantienen en su lugar por un número de proteínas que no son de tubulina (verde) que conforman el gran γ-TuRC. La nucleación por el γ-TuRC define la polaridad de los microtúbulos con un anillo de monómeros de alfatubulina situados en el extremo menos de la estructura.

FUENTE: *a*) Robert S McNeil/Baylor College of Medicine/Science Source Images; *b*) De Michelle Moritz, *et al*. *Nature* 1995;378:639, fig. 1b. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers, Ltd. Foto cedida por cortesía de David A. Agard.

rescentes contra la gammatubulina tiñen todos los tipos de MTOC, incluido el material pericentriolar de los centrosomas (figura 9-14*a*), lo que sugiere que la gammatubulina es un componente crítico en la nucleación de los microtúbulos. Esta conclusión es apoyada por otros estudios. Por ejemplo, las mutaciones en gammatubulina conducen a una nucleación reducida de los microtúbulos en los MTOC.

Para comprender el mecanismo de nucleación de los microtúbulos, los investigadores se han centrado en la estructura y composición del material pericentriolar (PCM) en la periferia de los centrosomas. Se cree que las fibras insolubles del PCM (figura 9-12*d*) sirven como sitios de unión para estructuras en forma de anillo que tienen el mismo diámetro que los microtúbulos (25 nm) y contienen gammatubulina. Estas estructuras en forma de anillo se descubrieron cuando los centrosomas se purificaron e incubaron con anticuerpos marcados con oro que se unieron a gammatubulina. Las partículas de oro se observaron en el microscopio electrónico para agruparse en semicírculos o anillos situados en los extremos negativos de los microtúbulos (figura 9-14*b*). Estos son los extremos de los microtúbulos que están incrustados en el PCM del centrosoma donde se produce la nucleación. Se han aislado complejos de anillo de gammatubulina similares (o γ-TuRC) de extractos celulares y se ha demostrado que nuclean el ensamblaje de microtúbulos *in vitro*. Los estudios estructurales han demostrado que γ-TuRC es una matriz helicoidal de subunidades gammatubulina (marrón), cada una unida con un conjunto de proteínas accesorias. La plantilla abierta con forma de anillo, similar a una arandela de seguridad, tiene 13 gammatubulinas por turno en las que se ensambla la primera fila de dímeros de alfa o betatubulina (figura 9-14*c*). El número de protofilamentos en el microtúbulo aparentemente está dictado por el número de gammatubulinas alrededor del anillo. En este modelo, solo la alfatubulina del heterodímero puede unirse a un anillo de subunidades γ. Por tanto, el γ-TuRC determina la polaridad de todo el microtúbulo y también forma una tapa en su extremo negativo, evitando la ganancia o pérdida de las subunidades de tubulina.

**REPASO**

1. ¿Qué es el centrosoma? ¿Qué componente del centrosoma nuclea los microtúbulos y cómo determina el número de protofilamentos?

## 9.6 Dinámica de microtúbulos

Los microtúbulos del citoesqueleto son polímeros dinámicos que están sujetos a acortamiento, alargamiento, desmontaje y montaje.

### Las propiedades dinámicas de los microtúbulos

Aunque todos los microtúbulos parecen bastante similares morfológicamente, existen marcadas diferencias en su estabilidad. Los microtúbulos del huso mitótico o el citoesqueleto son extremadamente lábiles, es decir, sensibles al desensamblaje. Los microtúbulos de las neuronas maduras son mucho menos lábiles, y los de centriolos, cilios y flagelos son muy estables. Estas diferencias en la estabilidad de los microtúbulos se determinan por las proteínas de los microtúbulos que interactúan incluyendo las MAP (figura 9-4) que estabilizan los microtúbulos, proteínas conocidas como TIP$^+$, que se unen al extremo más de los microtúbulos en crecimiento, y una enzima llamada katanina, el nombre de la espada samurai, que corta microtúbulos en piezas más cortas. La estabilidad de los microtúbulos también está regulada por modificaciones postraduccionales a las subunidades de tubulina, tales como la unión covalente de múltiples glutamatos en el extremo C de la tubulina. Las células vivas pueden someterse a una variedad de tratamientos artificiales que conducen al desensamblaje de microtúbulos citoesqueléticos lábiles sin alterar otras estructuras celulares. El desmontaje puede ser inducido por la tem-

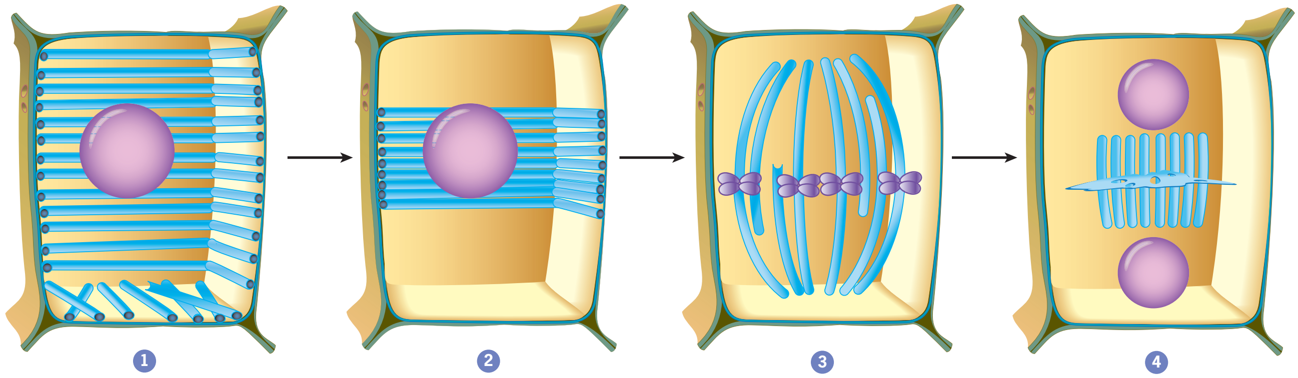



**FIGURA 9-15 Cuatro matrices principales de microtúbulos presentes durante el ciclo celular de una célula vegetal.** La organización de los microtúbulos en cada etapa se describe en el texto.

FUENTE: RH Goddard, *et al. Plant Physiol* 1994;104:2. Fisiología de las plantas por parte de la Sociedad Estadounidense de Físicos de las Plantas. Copyright 1994. Con permiso de American Society of Plant Biologists en el formato de libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

peratura fría, la presión hidrostática, la concentración elevada de $Ca^{2+}$ y una variedad de productos químicos, que incluyen la colchicina, la vinblastina, la vincristina y el nocodazol. El fármaco taxol detiene las actividades dinámicas de los microtúbulos por un mecanismo muy diferente. El taxol se une al polímero de microtúbulos, inhibiendo su desensamblaje, evitando así que la célula ensamble nuevas estructuras microtubulares según sea necesario. Muchos de estos compuestos, incluido el taxol, se usan en la quimioterapia contra el cáncer porque matan preferencialmente las células tumorales.

La labilidad de los microtúbulos del citoesqueleto refleja el hecho de que son polímeros formados por la asociación no covalente de bloques de construcción de proteínas. Los microtúbulos del citoesqueleto están normalmente sujetos a despolimerización y repolimerización a medida que los requisitos de la célula cambian de una vez a otra. El carácter dinámico del citoesqueleto microtubular está bien ilustrado por las células vegetales. Si se sigue una célula vegetal típica de una división mitótica a la siguiente, aparecen cuatro conjuntos distintos de microtúbulos, uno tras otro (**FIGURA 9-15**).

1. Durante la mayor parte de la interfase, los microtúbulos de una célula vegetal se distribuyen ampliamente a través de la corteza, como se muestra en la figura 9-15, etapa 1. La búsqueda de gammatubulina muestra que este factor de nucleación se localiza a lo largo de los microtúbulos corticales, sugiriendo que nuevos microtúbulos podrían formarse directamente en la superficie de los microtúbulos existentes. Esta idea es respaldada por estudios de incorporación de tubulina en células vivas (**FIGURA 9-16*a***) y por ensayos *in vitro* (figura 9-16*b*) que muestran microtúbulos recién formados que se ramifican en un ángulo a los lados de microtúbulos preexistentes. Una vez formados, es probable que los microtúbulos hijas se separen del microtúbulo original y se incorporen en los haces paralelos que rodean la célula (figuras 9-6*a*, 9-15).
2. A medida que la célula se acerca a la mitosis, los microtúbulos desaparecen de la mayoría de la corteza, dejando solo una banda transversal, llamada banda preprofasa, que rodea la célula como un cinturón (figura 9-15, etapa 2). La banda de preproceso marca el sitio del plano de división futuro.
3. A medida que la célula progresa hacia la mitosis, la banda preprofasa se pierde y los microtúbulos reaparecen en la forma del huso mitótico (figura 9-15, etapa 3).
4. Después de separar los cromosomas, el huso mitótico desaparece y es reemplazado por un conjunto de microtúbulos llamado fragmoplasto (figura 9-15, etapa 4), que desempeña un papel en la formación de la pared celular que separa las dos células hijas (véase figura 14-38).

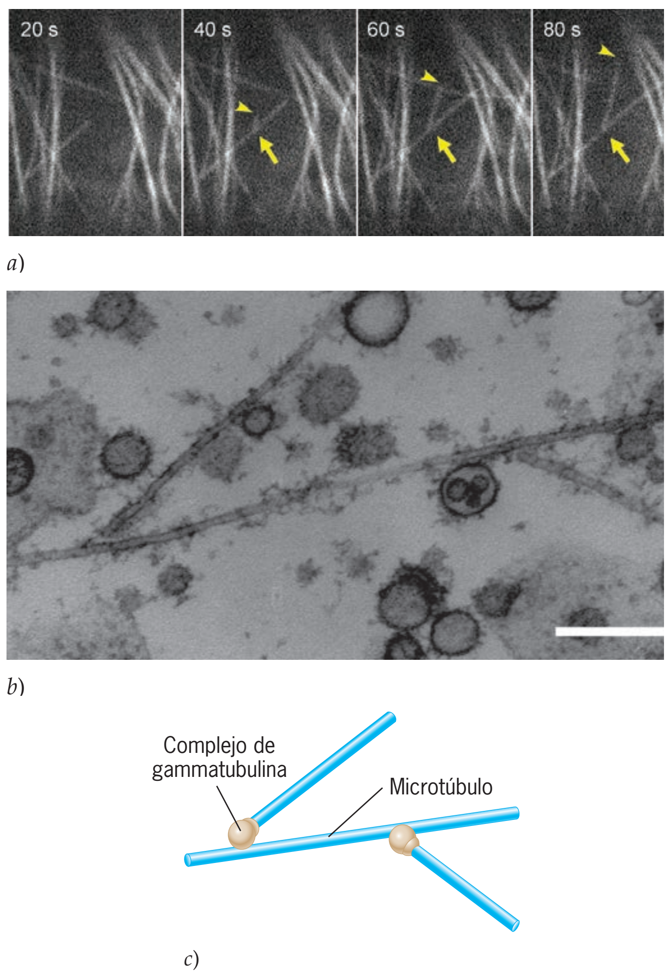



**FIGURA 9-16 Nucleación de microtúbulos corticales de plantas.** *a*) Las micrografías muestran una porción de una célula de tabaco cultivada en vivo que expresa GFP-tubulina marcada fluorescentemente. Durante el período de observación, un microtúbulo existente de la corteza nuclea el conjunto de un microtúbulo hijo, que crece hacia fuera formando una rama en forma de Y. El extremo de un microtúbulo recién formado está indicado por la punta de flecha, el punto de ramificación por la flecha. *b*) Microfotografía electrónica de un microtúbulo con dos microtúbulos hijos que se ramifican desde su superficie. Los microtúbulos ramificados se ensamblaron en un sistema libre de células que contenía subunidades de tubulina. Bar, 10 μm. *c*) Un modelo esquemático que muestra cómo se nuclean nuevos microtúbulos en los sitios de gammatubulina presentes en la superficie de un microtúbulo existente.

FUENTE: *b*) De Takashi Murata, *et al. Nature Cell Biol* 2005;7:961. Reproducida con permiso de Macmillan Publishers, Ltd.

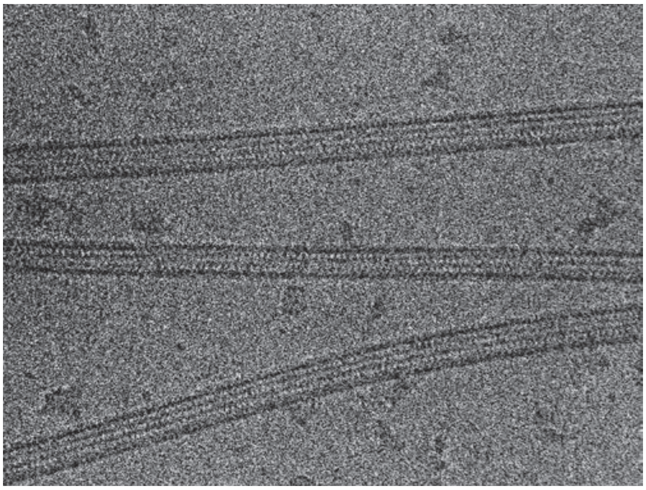


**FIGURA 9-17 Microtúbulos ensamblados en el tubo de ensayo.** Micrografía de electrones de microtúbulos congelados no fijados que se habían polimerizado *in vitro*. Los protofilamentos individuales y sus subunidades de tubulina globulares son visibles. Tenga en cuenta que el medio de los tres microtúbulos contiene solo 11 protofilamentos.

FUENTE: Cortesía de RH Wade, Instituto de Biología Structurale, Grenoble, Francia.

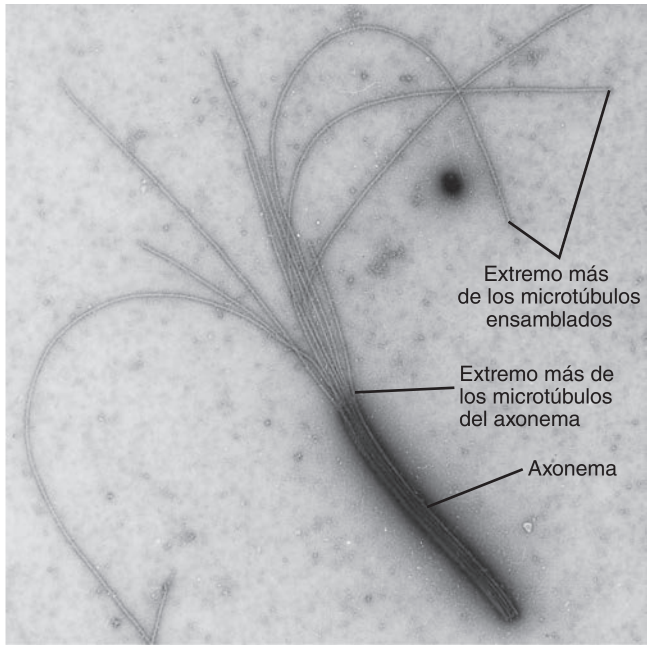



**FIGURA 9-18 El ensamblaje de tubulina en una estructura microtubular existente.** Microfotografía electrónica que muestra el ensamblaje *in vitro* de la tubulina cerebral en los extremos más de los microtúbulos de un axonema del flagelo *Chlamydomonas*.

FUENTE: Cortesía de LI Binder y Joel L Rosenbaum.

Se piensa que estos cambios dramáticos en la organización espacial de los microtúbulos se logran mediante una combinación de dos mecanismos separados: 1) la reorganización de los microtúbulos existentes y 2) el desmontaje de los microtúbulos existentes y el reensamblaje de los nuevos en diferentes regiones de la célula. En este último caso, los microtúbulos que forman la banda preprofasa se forman a partir de las mismas subunidades que unos minutos antes formaban parte de la matriz cortical o, antes de eso, del fragmoplasto.

## Las bases subyacentes de la dinámica de los microtúbulos

La comprensión de los factores que influyen en las tasas de ensamblaje y desmontaje de los microtúbulos surgió inicialmente de los estudios realizados *in vitro*. El primer enfoque exitoso para el ensamblaje *in vitro* de microtúbulos fue tomada en 1972 por Richard Weisenberg de la Universidad de Temple, quien descubrió que los microtúbulos se podían desmontar y volver a ensamblar una y otra vez simplemente bajando y elevando la temperatura de la mezcla de incubación. La **FIGURA 9-17** muestra tres microtúbulos que se ensamblaron en el tubo de ensayo a partir de tubulina purificada. Uno de los tres microtúbulos en esta figura contiene solo 11 protofilamentos (como lo indica su diámetro más delgado). No es de extrañar que los microtúbulos ensamblados *in vitro* puedan tener números anormales de protofilamentos porque carecen de una plantilla adecuada (figura 9-14*c*) proporcionada normalmente por los complejos del anillo de gammatubulina *in vivo*. El ensamblaje *in vitro* de microtúbulos es ayudado en gran medida por la adición de MAP o por piezas de microtúbulos o estructuras que contienen microtúbulos (**FIGURA 9-18**), que sirven como plantillas para la adición de subunidades libres. En estos estudios *in vitro*, las subunidades de tubulina se agregan principalmente al extremo positivo del polímero existente.

Los primeros estudios *in vitro* establecieron que se requiere GTP para el ensamblaje de microtúbulos. El ensamblaje de los dímeros de tubulina requiere que una molécula de GTP se una a la subunidad betatubulina.[2] Como resultado, la betatubulina no es solo una proteína estructural, también es una enzima, una GTPasa. La hidrólisis de GTP no es necesaria para la incorporación real del dímero en el extremo de un microtúbulo.

Por el contrario, el GTP se hidroliza a GDP poco después de que el dímero se incorpora a un microtúbulo, y el GDP resultante permanece unido al polímero ensamblado. Después de que un dímero se libera de un microtúbulo durante el desmontaje y entra en el grupo soluble, el PIB se reemplaza por un nuevo GTP. Este intercambio de nucleótidos "recarga" el dímero, lo que le permite servir una vez más como un bloque de construcción para la polimerización. Debido a que incluye la hidrólisis de GTP, el ensamblaje de un microtúbulo no es una actividad celular de bajo costo. ¿Por qué ha evolucionado una ruta de polimerización tan costosa? Para responder a esta pregunta, es útil considerar el efecto de la hidrólisis de GTP sobre la estructura de los microtúbulos. Cuando un microtúbulo está creciendo, el extremo más se ve bajo el microscopio electrónico como una lámina abierta a la que se agregan los dímeros de GTP [paso 1, **FIGURA 9-19*a*, 9-19*b***]. Durante los tiempos de rápido crecimiento de los microtúbulos, los dímeros de tubulina se agregan más rápidamente de lo que se puede hidrolizar su GTP.

Se cree que la presencia de un límite de dímeros de tubulina-GTP en los extremos superiores de los protofilamentos favorece la adición de más subunidades y el crecimiento de los microtúbulos. Sin embargo, se cree que los microtúbulos con extremos abiertos, como en el paso 1, figura 9-19*a*), experimentan una reacción espontánea que conduce al cierre del tubo (pasos 2 y 3). En este modelo, el cierre del tubo se acompaña de la hidrólisis del GTP unido, que genera subunidades que contienen tubulina unida al GDP. Las subunidades GDP-tubulina tienen una conformación diferente de sus precursores de GTP-tubulina y son menos adecuadas para ajustarse en un protofilamento recto. La tensión mecánica resultante desestabiliza el microtúbulo. La energía de tensión se libera a medida que los protofilamentos se curvan hacia afuera desde el extremo positivo del túbulo y se someten a despolimerización catastrófica [figura 9-19*a*, paso 4; 9-19*c*].

Por tanto, parece que la hidrólisis de GTP es un componente fundamental de la calidad dinámica de los microtúbulos. La ener-

[2] Una molécula de GTP también se une a la subunidad de alfatubulina, pero no es intercambiable y no se hidroliza después de la incorporación de la subunidad. Las posiciones de los nucleótidos de guanina en el heterodímero alfa betatubulina se muestran en la figura 9-3*c*.

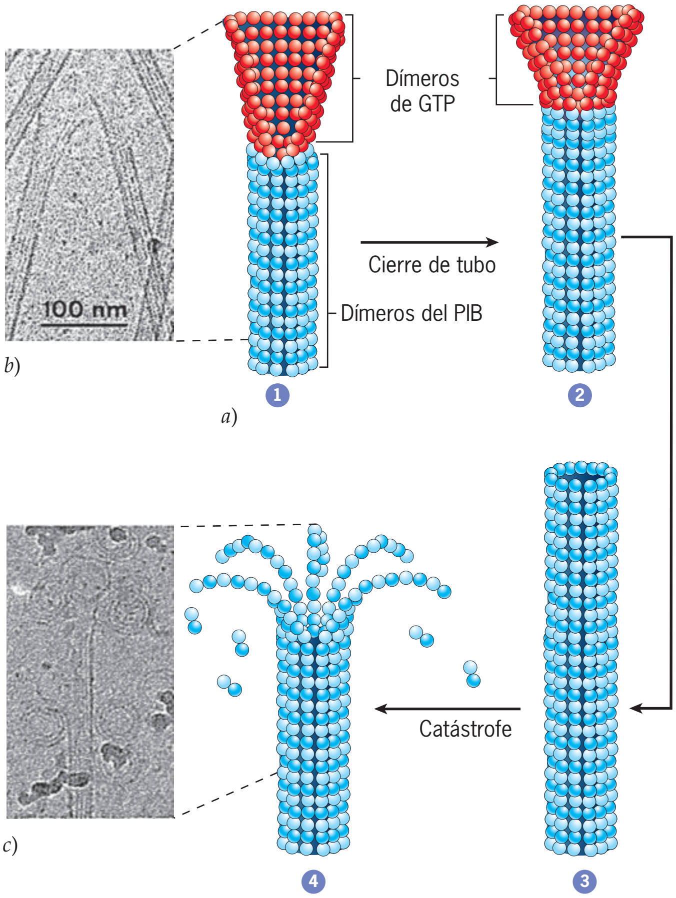



**FIGURA 9-19 El modelo de tapa estructural de la inestabilidad dinámica.** De acuerdo con el modelo, el crecimiento o la contracción de un microtúbulo depende del estado de los dímeros de tubulina en el extremo positivo del microtúbulo. Los dímeros de tubulina-GTP se representan en rojo. Los dímeros de tubulina-GDP se representan en azul. En un microtúbulo en crecimiento (paso 1), la punta consiste en una lámina abierta que contiene subunidades de tubulina-GTP. En el paso 2, el tubo ha comenzado a cerrarse, forzando la hidrólisis del GTP unido. En el paso 3, el tubo se ha cerrado hasta su extremo, dejando solo subunidades tubulina-GDP. Las subunidades GDP-tubulina tienen una conformación curva en comparación con sus contrapartes unidas a GTP, lo que las hace menos capaces de encajar en un protofilamento recto. La tensión resultante de la presencia de subunidades de tubulina del GDP en el extremo positivo del microtúbulo se libera a medida que los protofilamentos se curvan hacia fuera del túbulo y experimentan una contracción catastrófica (paso 4). *b*) Imagen Cryo-EM del extremo creciente de un microtúbulo que muestra una lámina curva, abierta. *c*) Imagen Cryo-EM del extremo de contracción de un microtúbulo que muestra protofilamentos curvados hacia afuera.

FUENTE: *a*) AA Hyman y E Karsenti. *Cell* 1996;84:402, con permiso de Cell Press. Cell por Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de diario por medio de copyright cle center; *b*) Cortesía de Thomas Meuller-Reichert, TU Dresden, Medical Theoretical Center (MTZ) y Anthony A Hyman, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics.

gía de tensión almacenada en un microtúbulo como resultado de la hidrólisis de GTP hace que el microtúbulo sea intrínsecamente inestable y, en ausencia de otros factores estabilizadores tales como las MAP, capaces de desensamblarse poco después de su formación. Los microtúbulos pueden encogerse notablemente rápido, en especial *in vivo*, lo que permite a una célula desensamblar su citoesqueleto microtubular muy rápidamente.

El carácter dinámico del citoesqueleto microtubular dentro de una célula se puede revelar expresando tubulina etiquetada con GFP en células vivas o inyectando tubulina con etiquetas químicas que permiten que se visualice en células fijas (**FIGURA 9-20**). Si se observan microtúbulos individuales bajo un microscopio de fluorescencia, parecen crecer lentamente durante un periodo y luego encogerse rápida e inesperadamente, como se ilustra por el microtúbulo que se sigue en la **FIGURA 9-21**. Debido a que el cambio de crecimiento a contracción (un evento denominado catástrofe) ocurre con alta frecuencia *in vivo*, la mayoría de los microtúbulos desaparecen de la célula en cuestión de minutos y son reemplazados por nuevos microtúbulos que crecen desde el centrosoma. Si se inyectan cantidades particularmente pequeñas de proteína marcada fluorescentemente, los filamentos del citoesqueleto ya no son etiquetados de modo uniforme como en la figura 9-4, pero en su lugar contienen puntos fluorescentes espaciados irregularmente como se ve en la figura 9-21. Estas manchas fluorescentes sirven como marcadores fijos para seguir los cambios dinámicos en la longitud o la orientación del filamento. Esta técnica, conocida como microscopía de moteado de flourescencia, permite medir la dinámica de los microtúbulos con alta precisión dentro de las células vivas.

En 1984, Timothy Mitchison y Marc Kirschner de la Universidad de California, San Francisco, informaron sobre las propiedades de los microtúbulos individuales y propusieron que el comportamiento de los microtúbulos *in vivo* podría explicarse por un fenómeno que denominaron **inestabilidad dinámica**. La inestabilidad dinámica explica la observación 1) de que los microtúbulos en crecimiento y contracción pueden coexistir en la misma región de una célula y 2) que un microtúbulo determinado puede cambiar de forma impredecible (estocástica) entre fases de crecimiento y acortamiento, como en la figura 9-21. La inestabilidad dinámica es una propiedad inherente de los microtúbulos en sí y, más específicamente, del extremo positivo de los microtúbulos. Como se indica en la figura 9-19, es el extremo positivo donde las subunidades se agregan durante el crecimiento y se pierden durante la contracción. Esto no significa que la inestabilidad dinámica no pueda verse influida por factores externos. Por ejemplo, las células contienen una gran variedad de proteínas (llamadas + TIP) que se unen a los extremos más dinámicos de los microtúbulos (**FIGURA 9-22**). Algunos de estos +TIP regulan la tasa de creci-

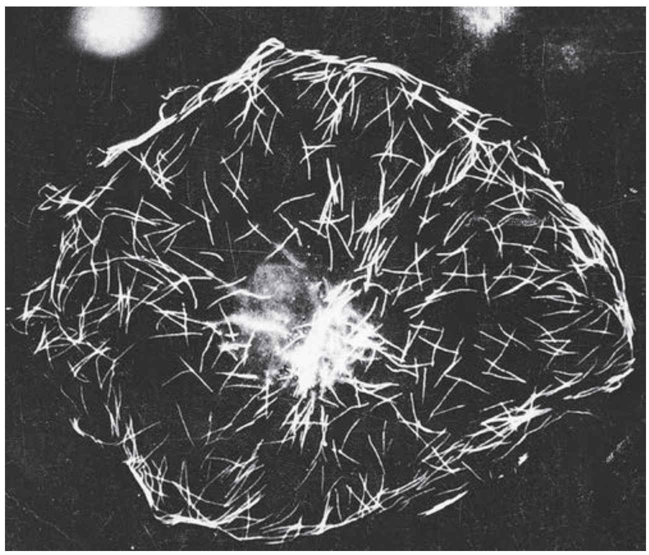


**FIGURA 9-20 Dinámica de microtúbulos en células vivas.** Este fibroblasto cultivado se inyectó con un pequeño volumen de tubulina que se había unido covalentemente a biotina, una molécula pequeña cuya ubicación en la célula se determina fácilmente usando anticuerpos fluorescentes antibiotina. Aproximadamente un minuto después de la inyección, las células se fijaron y se determinó la ubicación de la tubulina biotinilada que se había incorporado a los microtúbulos insolubles. Es evidente a partir de esta micrografía de fluorescencia que, incluso durante períodos tan cortos como de un minuto, las subunidades de tubulina se incorporan ampliamente en los extremos crecientes de los microtúbulos del citoesqueleto.

FUENTE: Tomada de Marc Kirschner. *J Cell Biol* 1986;102, portada del nro. 3; Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

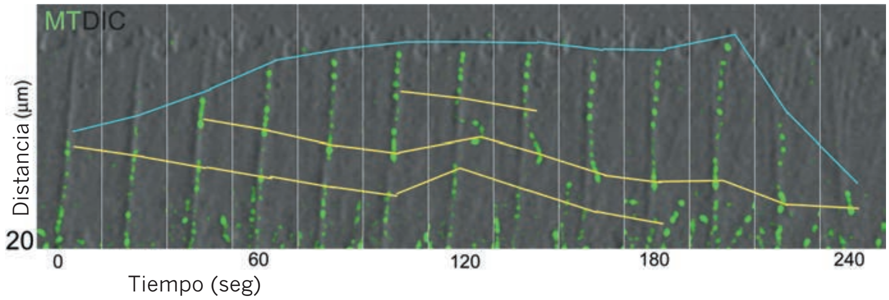



**FIGURA 9-21 Inestabilidad dinámica.** Esta serie de fotografías muestra los cambios en la longitud de un solo microtúbulo en el cono de crecimiento de una neurona. La célula se microinyectó con tubulina marcada de modo fluorescente a una concentración suficientemente baja para producir motas fluorescentes verdes a lo largo de la longitud de los microtúbulos. Como se discutió en la página 326, tales motas proporcionan puntos de referencia fijos que se pueden seguir a lo largo del tiempo. Cada una de las líneas horizontales amarillas conecta una de estas motas de un punto de tiempo a otro. La línea azul indica el extremo más aproximado del microtúbulo en varios puntos de tiempo. De 0 a aproximadamente 200 segundos, el microtúbulo experimenta una adición gradual de subunidades de tubulina en su extremo positivo. Luego, de aproximadamente 200 a 240 segundos, el microtúbulo experimenta una contracción rápida.

FUENTE: Tomada de Andrew W Schaefer, Nurul Kabir y Paul Forscher, Universidad de Yale. *J Cell Biol* 2002;158:145, fig. 5. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

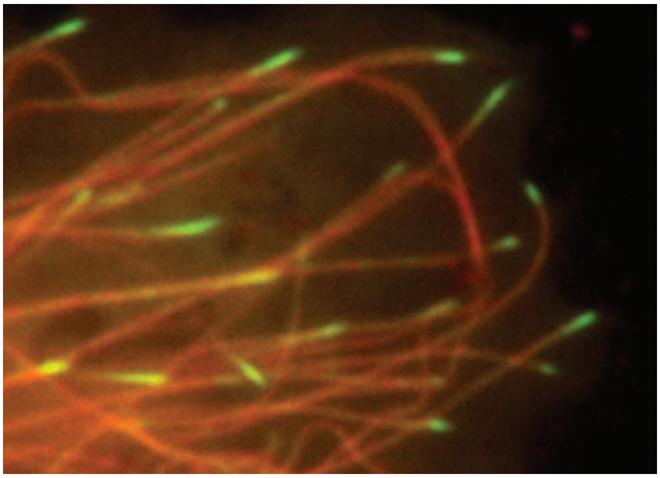


**FIGURA 9-22 Unión de una proteína de seguimiento de extremo más de microtúbulo (+TIP).** La micrografía muestra una imagen en vivo de un fibroblasto de pulmón humano que expresa tubulina marcada con mCherry (que genera microtúbulos rojos) y EB3 marcada con GFP, a +TIP (que aparece en verde). Se ve que EB3 se une a los extremos positivos de los microtúbulos.

FUENTE: Tomada de Anna Akhmanova y Michel O Steinmetz. *J Cell Science* 2010;123:3415; con permiso de la Compañía de Biólogos. Cortesía de Anna Akhmanova e Ilya Grigoriev, Universidad de Utrecht, Países Bajos.

miento o contracción de los microtúbulos o la frecuencia de interconversión entre las dos fases.

Otros +TIP median la unión del extremo más del microtúbulo a una estructura celular específica, como el cinetocoro de un cromosoma mitótico durante la división celular o el citoesqueleto de actina de la corteza durante el transporte de vesículas. Una vez que una estructura subcelular se une al extremo positivo de un microtúbulo, las propiedades dinámicas de los microtúbulos pueden ejercer fuerza sobre esa estructura. La polimerización de un microtúbulo puede empujar sobre un objeto unido, mientras que la despolimerización de un microtúbulo puede tirar de un objeto adjunto. Por ejemplo, este tipo de fuerza de tracción juega un papel importante en la segregación de los cromosomas durante la división celular (sección 14.2).

La inestabilidad dinámica proporciona un mecanismo mediante el cual los extremos positivos de los microtúbulos pueden explorar rápidamente el citoplasma para los sitios de inserción apropiados. El accesorio estabiliza temporalmente los microtúbulos y permite que la célula construya las complejas redes del citoesqueleto discutidas en este capítulo. La inestabilidad dinámica también permite que las células respondan rápidamente a las condiciones cambiantes que requieren la remodelación del citoesqueleto microtubular. Uno de los ejemplos más dramáticos de tal remodelación ocurre en la mitosis cuando los microtúbulos del citoesqueleto se desmontan y se remodelan en un huso mitótico bipolar. Esta reorganización está asociada con un cambio marcado en la estabilidad de los microtúbulos; los microtúbulos en las células interfásicas tienen vidas medias que son de 5 a 10 veces más largas que los microtúbulos en las células mitóticas. A diferencia de los microtúbulos del huso mitótico o del citoesqueleto, los microtúbulos de los organelos que se analizarán a continuación carecen de actividad dinámica y, en cambio, son muy estables.

**REPASO**

1. ¿Cuál es el papel de GTP en el ensamblaje de microtúbulos? ¿Qué se entiende por el término inestabilidad dinámica? ¿Qué papel juega en la actividad celular?

## 9.7 Estructura y función de los cilios y flagelos

Cualquiera que haya colocado una gota de agua del estanque bajo la lente de un microscopio y haya tratado de evitar que un protozoo salga del campo de visión puede apreciar la actividad de **cilios** y **flagelos**. Los cilios y flagelos son organelos en forma de pelos, a veces móviles, que se proyectan desde la superficie de una variedad de células eucariotas. Muchas células en el cuerpo humano contienen un solo cilio no móvil (**FIGURA 9-23*a***). Por ejemplo, dentro del riñón, los cilios no móviles actúan como sensores de flujo para el flujo de fluido (figura 9-23*a*). En otros tejidos, grandes mechones de cilios móviles crean flujos de líquido (figura 9-23*c*). Las bacterias también poseen estructuras llamadas flagelos, pero los flagelos procarióticos son filamentos simples que no tienen una relación evolutiva con sus contrapartes eucarióticas (véase figura 1-14). La discusión que sigue se refiere solo a los organelos eucarióticos.

Los cilios y flagelos son dos palabras que se refieren exactamente a la misma estructura en diferentes contextos, al igual que los términos "estrella de la tarde" y "estrella de la mañana", que se refieren al planeta Venus pero a diferentes horas del día. Basados principalmente en convenciones históricas, la mayoría de los biólogos usan uno u otro término según el tipo de célula desde la cual se proyecta el organelo y su patrón de movimiento. De acuerdo con esta distinción, un cilio puede asemejarse a un remo ya que mueve la célula en una dirección perpendicular al propio cilio. En su carrera de poder, el cilio se mantiene en un estado rígido (**FIGURA 9-24*a***) cuando empuja contra el medio circundante. En su carrera de recuperación, el cilio se vuelve flexible, ofreciendo poca resistencia al medio. Los cilios tienden a producirse en grandes cantidades en la superficie de una célula, y su actividad de latido generalmente se coordina (figura 9-24*b*). En organismos multicelulares, los cilios mueven fluido y material particulado a través de varios tractos. En humanos, por ejemplo,

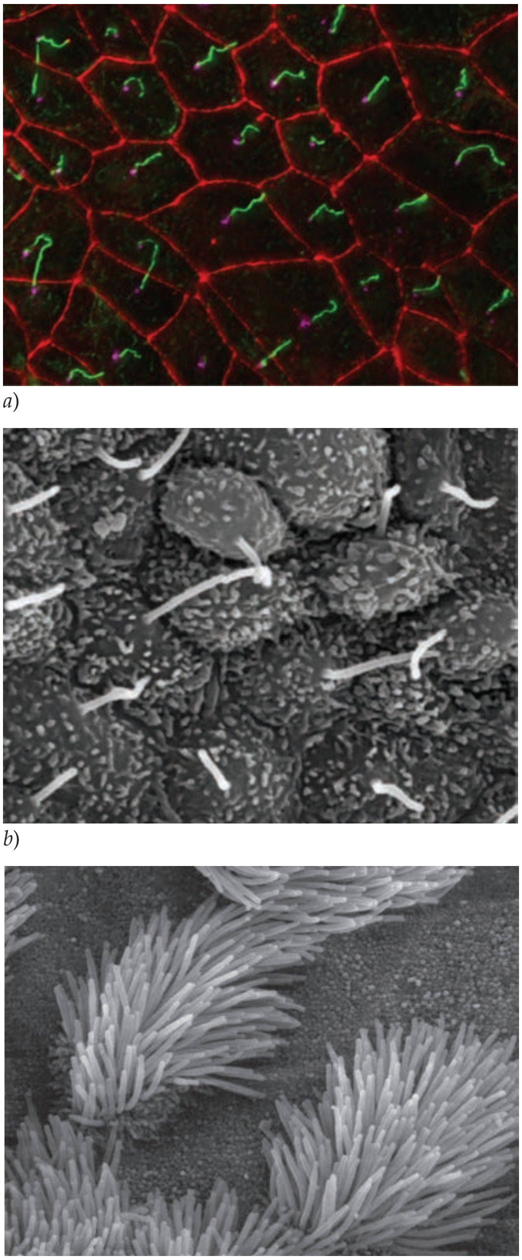



**FIGURA 9-23 Cilios en el cuerpo humano.** *a*) Imagen de inmunofluorescencia que muestra un único cilio primario (verde) que se proyecta desde la superficie apical de cada célula en un cultivo de células de conductos colectores de riñón. Las uniones intercelulares entre las células epiteliales se muestran en rojo. *b*) Cilios visualizados en un embrión de ratón en desarrollo mediante microscopía electrónica de barrido. *c*) Mechones de cilios móviles que recubren la tráquea.

FUENTE: *a*) Cortesía de Wallace Marshall; *b*) Cortesía de Wallace Marshall; *c*) Instalación de microscopio electrónico Charles Daghlian/Dartmouth College.

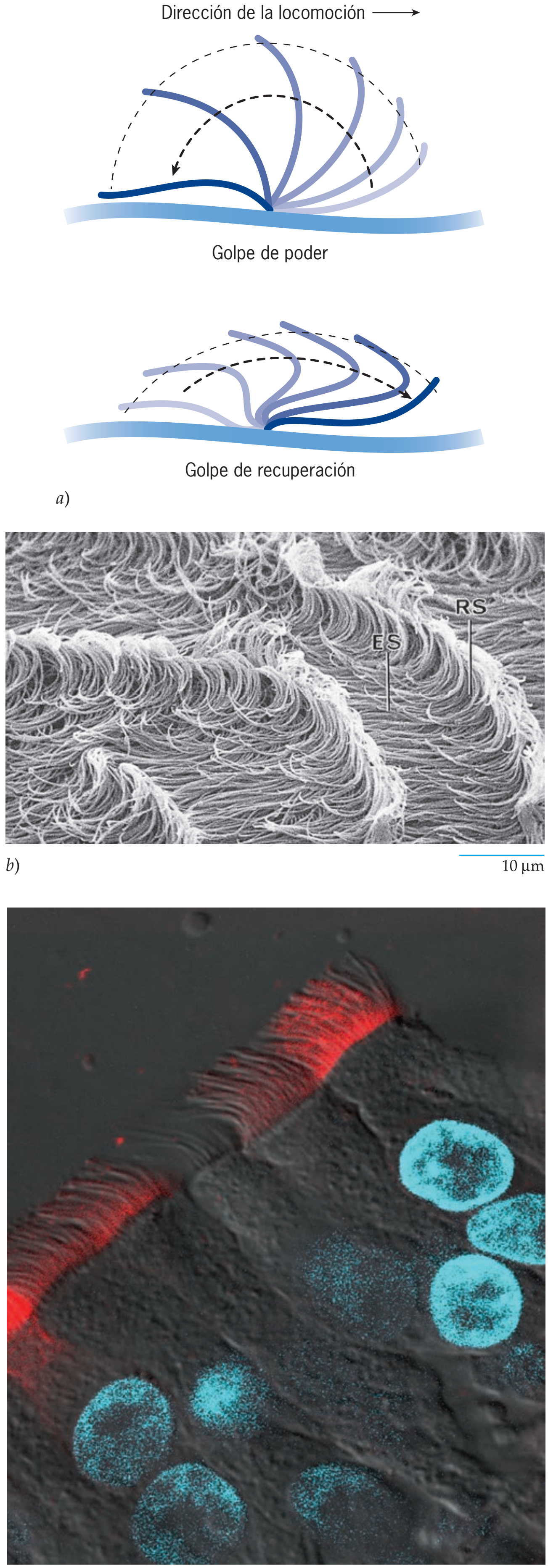



**FIGURA 9-24 Golpe ciliar.** *a*) Las diversas etapas en el ritmo de un cilio. *b*) Los cilios en la superficie de un protozoo latido en ondas metacrónicas en las que los cilios en una fila determinada se encuentran en la misma etapa del ciclo de latido, pero los que están en filas adyacentes están en una etapa diferente. RS (*cilia in recovery stroke*): cilios en recuperación de apoplejía; ES (*cilia in effective power stroke*): cilios en el golpe de poder efectivo. *c*) Células epiteliales bronquiales humanas en las cuales los cilios en la superficie luminal se etiquetan de rojo y los núcleos se etiquetan de azul.

FUENTE: *a*) Cortesía de GA Horridge y SL Tamm. *Science* 1969;163:818. Reimpreso con permiso de AAAS; *b*) Tomada de GA Horridge y SL Tamm. *Science* 1969;163:818. Reimpreso con permiso de AAAS; *c*) Tomada de Seiko F Okada, *et al*. *J Biol Chem* 2006;281:22995, fig. 2c, © 2006. Sociedad Americana de Bioquímica y Biología Molecular. Foto cortesía de Seiko F Okada.

el epitelio ciliado que recubre el tracto respiratorio impulsa la mucosidad y los desechos atrapados lejos de los pulmones (figura 9-24*c*).

No todos los cilios son móviles: casi todas las células del cuerpo humano contienen un único cilio no móvil (llamado un cilio primario) que se cree que tiene una función sensorial, el seguimiento de las propiedades mecánicas y químicas de los fluidos extracelulares (figura 9-23*a*). Los cilios primarios contienen receptores y canales que les permiten servir como antenas sensoriales. Los cilios sensoriales especializados incluyen cilios que detectan el flujo de fluido en el riñón, los cilios olfativos en la nariz que perciben el olor y los segmentos externos de las células de la vara y el cono en la retina, que de hecho son cilios primarios altamente especializados. Dada la ubicuidad de los cilios y sus muchos roles en la sensación y la motilidad, los defectos en los cilios pueden conducir a una gama de enfermedades humanas, como se discute en la sección adjunta "Perspectiva humana".

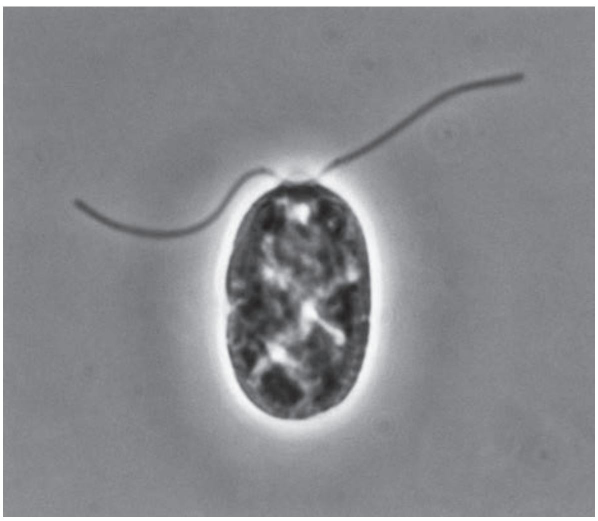
Los flagelos típicamente ocurren de modo individual o en parejas y exhiben una variedad de diferentes patrones de latido (formas de onda), dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, el alga unicelular representada en la **FIGURA 9-25*a*)** se adelanta al agitar sus dos flagelos de una manera asimétrica que se asemeja a las brazadas de un nadador humano (figura 9-25*b*). Esta misma célula de alga también puede empujarse a través del medio usando un ritmo simétrico que se asemeja al de un espermatozoide. El grado de asimetría en el patrón del latido en la célula de las algas está regulado por la concentración interna de iones de calcio.

## Estructura de los cilios y flagelos

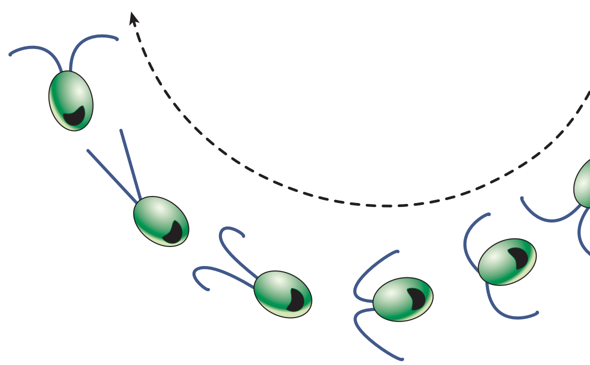
Una micrografía electrónica de una sección transversal de un cilio o flagelo es una de las imágenes más familiares en biología celular (**FIGURA 9-26*a***). Toda la proyección ciliar o flagelar está cubierta por una membrana que está al lado de la membrana plasmática de la célula. El núcleo del cilio, llamado **axonema**, contiene una matriz de microtúbulos que recorren longitudinalmente todo el organelo. Con raras excepciones, el axonema de un cilio o un flagelo móvil consiste en nueve microtúbulos dobles periféricos que rodean un par central de microtúbulos individuales. Esta misma estructura microtubular, que se conoce como la matriz 9+2, se ve en axonemas de protistas a mamíferos y sirve como otro de los muchos recordatorios de que todos los organismos eucariotas vivos han evolucionado a partir de un ancestro común. Todos los microtúbulos del axonema tienen la misma polaridad: sus extremos más están en la punta de la proyección y sus extremos menos en la base. Cada doblete periférico consiste en un microtúbulo completo, el túbulo A y un microtúbulo incompleto, el túbulo B, este último contiene 10 u 11 subunidades en lugar de los 13 habituales.

La estructura básica del axonema fue descrita por primera vez en 1952, en plantas inferiores por Irene Manton y en animales por Don Fawcett y Keith Porter. (Los flagelos se perdieron durante la evolución de las plantas superiores, pero todavía están presentes en el esperma de plantas inferiores, tales como musgo y helechos.) A medida que el poder de resolución de los microscopios electrónicos ha mejorado, algunos de los componentes menos obvios se hicieron visibles (figura 9-26*b*). Se observó que los túbulos centrales estaban encerrados por la vaina central, que está conectada a los túbulos A de los dobletes periféricos mediante un conjunto de rayos radiales. Los dobletes están conectados entre sí por un puente entre parejas compuesto por un enlace elástico basado en proteínas llamado enlace de nexina. Ahora se sabe que la nexina es parte de un complejo bioquímico que contiene proteínas que regulan la actividad de la dineína, llamado el complejo regulador nexina-dineína o N-DRC. De particular importancia fue la observación de que un par de "brazos" —un brazo interno y un brazo externo— se proyectan desde el túbulo A (figura 9-26*a*, *b*). Estos brazos están compuestos por dineínas axonemales, complejos proteicos relacionados con la dineína citoplásmica que son responsables de generar el movimiento de flexión en cilios y flagelos. Una sección longitudinal, es decir, un corte a través del axonema paralelo a su eje largo, revela la naturaleza continua de los microtúbulos y la naturaleza discontinua de los otros elementos (**FIGURA 9-27 *a,b***).

Como se señaló anteriormente, un cilio o flagelo emerge de un cuerpo basal (**FIGURA 9-28*a***) similar en estructura al centriolo de la figura 9-12*a*. Si el cuerpo basal surge de un centriolo que ya había estado presente durante la división celular precedente, el cilio que produce se denomina "cilio primario". Generalmente no son móviles como se discutió con anterioridad. En algunas células



*a*)



*b*)

**FIGURA 9-25 Flagelos eucarióticos.** *a*) El alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Los dos flagelos aparecen en verde después de unirse a un anticuerpo fluorescente dirigido contra una proteína de la membrana flagelar principal. El color rojo es el resultado de la autofluorescencia de la clorofila de la célula. A diferencia de muchos organismos flagelados, *Chlamydomonas* no necesita sus flagelos para sobrevivir y reproducirse, por lo que las cepas mutantes que exhiben varios tipos de defectos flagelares se pueden cultivar. *b*) El movimiento hacia delante *Chlamydomonas* se realiza mediante una forma de onda asimétrica que se asemeja al golpe de pecho. En la figura 9-35 se muestra un tipo diferente de forma de onda flagelar.

FUENTE: Biophoto Associates/Science Source Images.

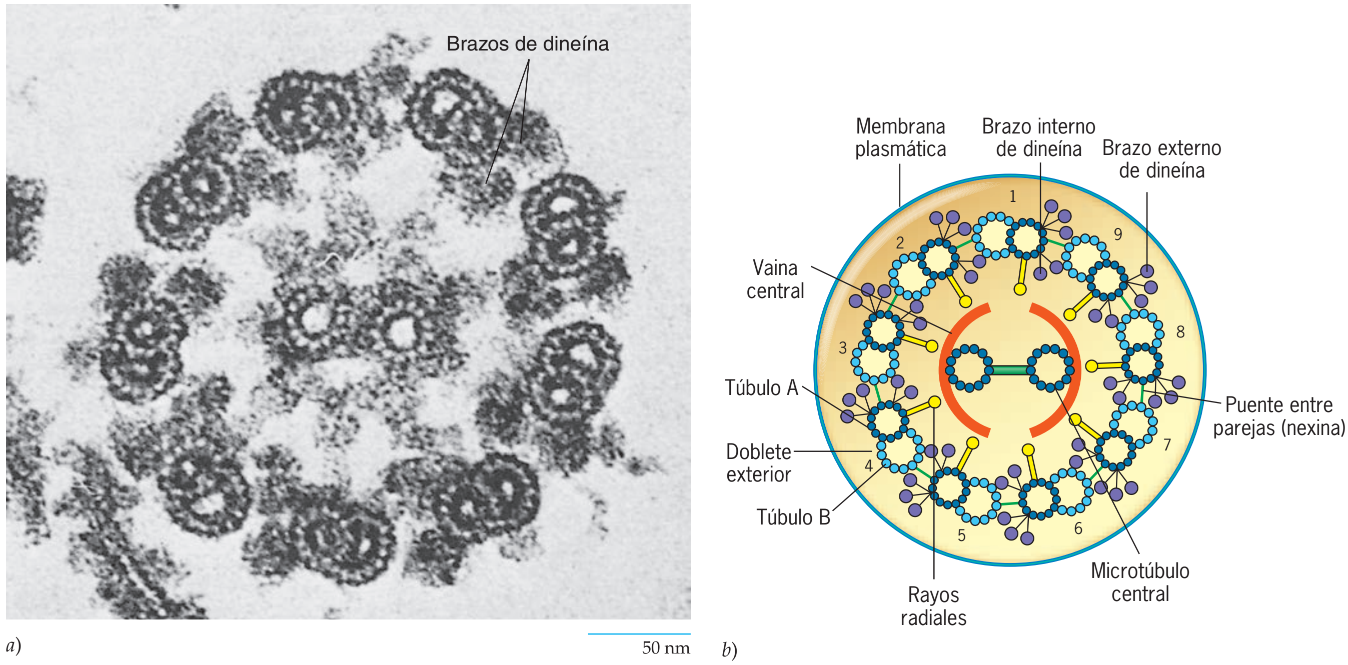



**FIGURA 9-26 La estructura de un axonema ciliar o flagelar.** *a*) Sección transversal a través de un axonema de esperma. Se considera que los dobletes periféricos consisten en un microtúbulo completo e incompleto, mientras que los dos microtúbulos centrales están completos. Los brazos de dineína se ven como proyecciones "borrosas" de la pared del microtúbulo completo. La estructura molecular de estos brazos se analiza en una sección posterior. *b*) Diagrama esquemático de un axonema de un protista que muestra la estructura de las fibras microtubulares, los dos tipos de brazos de dineína (brazos exteriores de tres cabezas y brazos internos de dos cabezas), los enlaces de nexina entre los dobletes, la vaina central que rodea los microtúbulos centrales y los radios radiales que se proyectan desde los dobletes externos hacia la vaina central. Se ha obtenido una visión más detallada y compleja de la arquitectura molecular del axonema con la aplicación de la tomografía crioelectrónica (sección 18.2); véase PNAS 2005;102:15889, Science 2006;313:944, y J Cell Biol 2009;187:921. (*Nota:* Los cilios y flagelos de los animales típicamente contienen brazos de dineína externos de dos cabezas.)

FUENTE: *a*) Cortesía de Lewis Tilney y K Fujiwara.

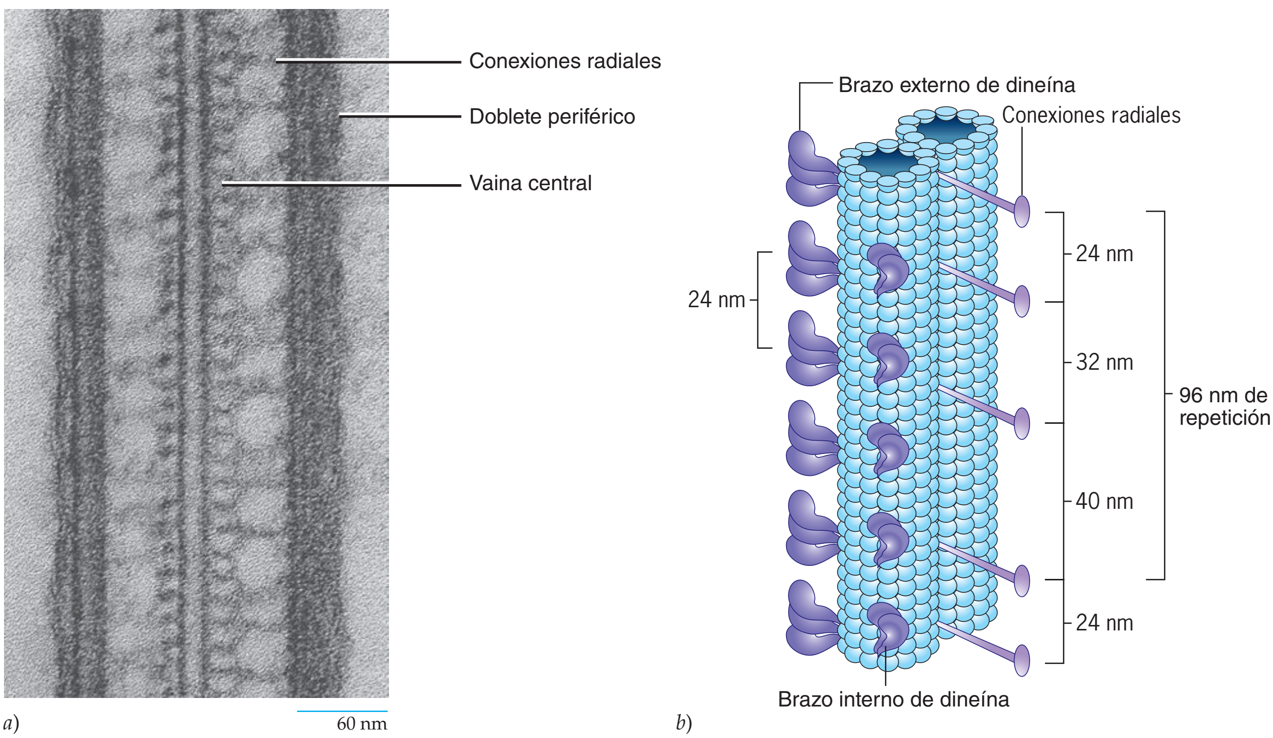



**FIGURA 9-27 Vista longitudinal de un axonema.** *a*) Microfotografía electrónica de una sección longitudinal mediana de una región recta de un cilio. Los radios radiales se unen a la vaina central con el microtúbulo A del doblete. *b*) Diagrama esquemático de una sección longitudinal de un doblete flagelar. Los radios radiales emergen en grupos de tres, que se repiten (a 96 nm en este caso) a lo largo de la longitud del microtúbulo. Los brazos de dineína exterior están espaciados a intervalos de 24 nm.

FUENTE: De Fred D. Warner y Peter Satir. *J Cell Biol* 1974;63:41, fig. 4. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

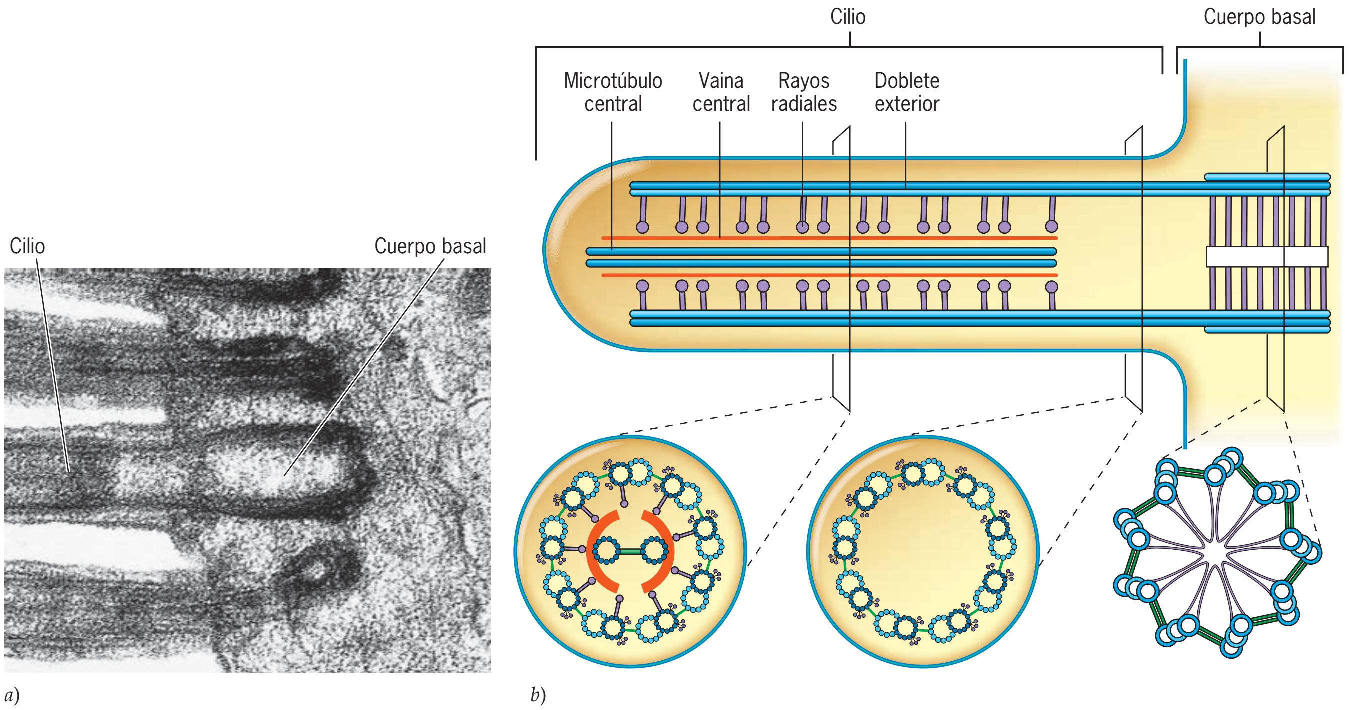



**FIGURA 9-28 Cuerpos basales y axonemas.** *a*) Microfotografía electrónica de una sección longitudinal a través de los cuerpos basales de varios cilios en la superficie apical de las células epiteliales de un oviducto de conejo. Estos cuerpos basales surgen de centriolos que se generan en el citoplasma y migran a sitios debajo de la membrana plasmática. *b*) Diagrama esquemático de la relación estructural entre los microtúbulos del cuerpo basal y el axonema de un cilio o flagelo.

FUENTE: *a*) Cortesía de RGW Anderson.

que producen grandes cantidades de cilios, los cilios adicionales están nucleados por nuevos cuerpos basales que se forman después de la división y, por tanto, se denominan cilios secundarios. En tales casos, los cuerpos basales no se forman por el proceso típico de duplicación del centriolo, sino que se ensamblan en grandes estructuras amorfas llamadas deuterosomas. Los túbulos A y B del cuerpo basal se alargan para formar los dobletes del cilio o flagelo (figura 9-28*b*). Si un cilio o flagelo se desprende de la superficie de una célula viva, se regenera un nuevo organelo como una consecuencia del cuerpo basal. Al igual que con otras estructuras microtubulares, el crecimiento de un axonema se produce en los extremos más (exterior) de sus microtúbulos. ¿Cómo organiza y mantiene una célula un sitio de construcción en la punta externa de un axonema situado a micrómetros del cuerpo de la célula donde tiene lugar la síntesis de materiales de construcción?

## Crecimiento por transporte intraflagelar

Cuando los cilios y los flagelos se ensamblan, todo el crecimiento se restringe a sus puntas distales, y esto requiere una forma para que las proteínas hechas dentro de la célula salgan a la punta donde se realiza el ensamblaje. Los biólogos han estado observando los flagelos de las células vivas durante más de cien años, pero no fue sino hasta 1993 que Joel Rosenbaum y sus colegas en la universidad de Yale observaron el movimiento de partículas en el espacio entre los dobletes periféricos y la membrana plasmática circundante y denominó a este movimiento **transporte intraflagelar** (**IFT**, *intraflagellar transport*, **FIGURA 9-29**). Las partículas en movimiento que se ven en el IFT son complejos de 20 proteínas, conocidas como proteínas IFT, que se ensamblan en un complejo de proteína llamado partícula IFT. Estas partículas IFT se alinean para formar matrices lineales llamadas trenes IFT, y estos trenes se trasladan a la punta del cilio a través de los extremos más y menos de la proteína motora, la cinesina 2. Los trenes IFT se devuelven al cuerpo de la célula mediante un complejo de dineína citoplásmica. Las partículas de IFT transportan proteínas de carga como la tubulina, necesarias para construir cilios, hasta la punta para el ensamblaje, y la inhibición de IFT evita el ensamblaje de cilios y flagelos. Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas IFT han sido herramientas importantes para probar la función de los cilios en el desarrollo y la fisiología porque dan como resultado la pérdida completa de los cilios.

## El mecanismo de la locomoción ciliar y flagelar

Como se discutirá más adelante en este capítulo, la contracción de los músculos resulta del deslizamiento de los filamentos de actina sobre los filamentos de miosina adyacentes. La fuerza de deslizamiento es generada por puentes cruzados en forma de trinquete que residen en la cabeza de la molécula de miosina. Con el sistema muscular como modelo, se propuso que el movimiento ciliar podría explicarse por el deslizamiento de los dobletes microtubulares adyacentes entre sí. De acuerdo con esta propuesta, los brazos de dineína representados en la **FIGURA 9-30** actúan como puentes cruzados oscilantes que generan las fuerzas requeridas para el movimiento ciliar o flagelar. La secuencia de eventos se muestra en la **FIGURA 9-31**.

En el axonema intacto, el pedúnculo de cada molécula de dineína (con sus cadenas intermedias y ligeras asociadas) está firmemente anclado a la superficie externa del túbulo A, con las cabezas y pedúnculos globulares que se proyectan hacia el túbulo B del doblete vecino. En el paso 1 de la figura 9-31, los brazos de dineína anclados a lo largo del túbulo A del tercio superior inferior se unen a los sitios de unión en el túbulo B del doblete superior. En el paso 2, las moléculas de dineína experimentan un cambio de conformación, o golpe de poder, que hace que el doblete inferior se deslice hacia el extremo basal del doblete superior. Este cambio conformacional en una cadena pesada de dineína se representa en la figura 9.30*b-d*. En el paso 3 de la figura 9-31, los brazos de dineí-

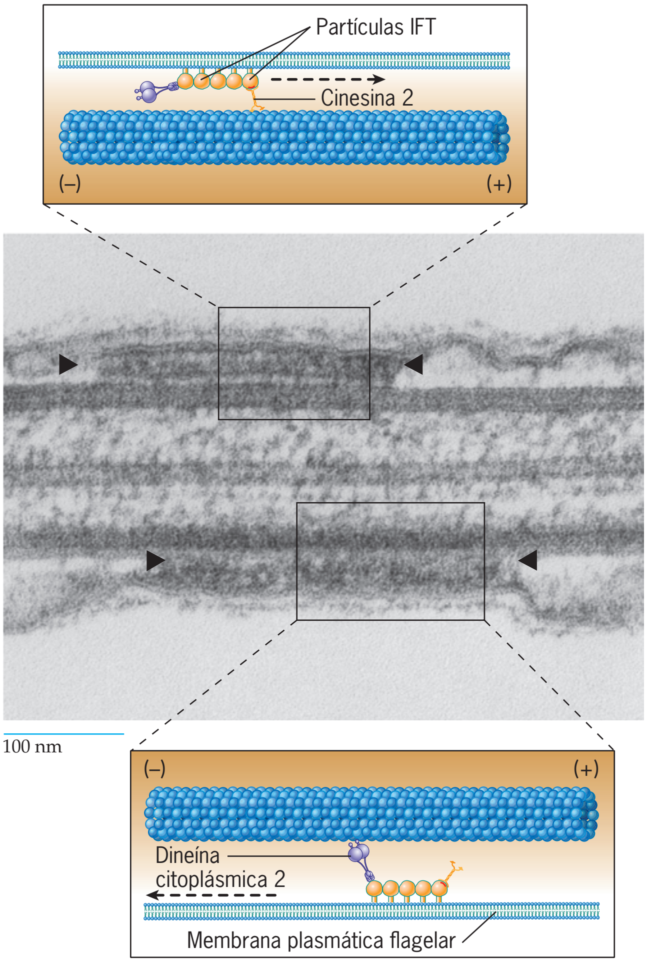



**FIGURA 9-29 Transporte intraflagelar (IFT).** Microfotografía electrónica de una sección longitudinal del flagelo *Chlamydomonas* que muestra dos filas de partículas de proteína (delimitadas por puntas de flecha) situadas entre los microtúbulos dobles externos y la membrana plasmática flagelar. Como se ilustra en las inserciones, cada fila de partículas y su carga asociada de proteínas axonemal se mueven a lo largo del microtúbulo doble externo por una proteína motora, ya sea dineína citoplásmica 2 si se mueven hacia la base flagelar o cinesina 2 si las partículas se están moviendo hacia la punta del flagelo.

FUENTE: Micrografía de Keith G Kozminski, *et al. J Cell Biol* 1995;131:1520, fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de Joel L Rosenbaum.

na se han desprendido del túbulo B del doblete superior. En el paso 4, los brazos se han vuelto a unir al doblete superior para que pueda comenzar otro ciclo. (En la figura 18-21 se muestra una micrografía electrónica de un axonema que muestra los brazos de dineína de un doblete unido al doblete adyacente.)

El componente de enlace nexina del N-DRC forma un enlace elástico que conecta los dobletes adyacentes (figura 9-26*b*). Estos puentes de nexina juegan un papel importante en el movimiento ciliar/flagelar limitando la extensión en que los dobletes adyacentes pueden deslizarse uno sobre el otro. La resistencia al deslizamiento proporcionada por los puentes de nexina hace que el axonema se doble en respuesta a la fuerza de deslizamiento. El deslizamiento en un lado del axonema se alterna con el deslizamiento en el otro lado, de modo que una parte del cilio o flagelo se dobla primero en una dirección y luego en la dirección opuesta (**FIGURA 9-32**). Esto requiere que, en cualquier momento dado, los brazos de dineína en un lado del axonema estén activos, mientras que aquellos en el otro lado estén inactivos.

Como resultado de esta diferencia en la actividad de dineína, los dobletes en el lado interno de la curva (en la parte superior e inferior de la figura 9-32) se extienden más allá de los del lado

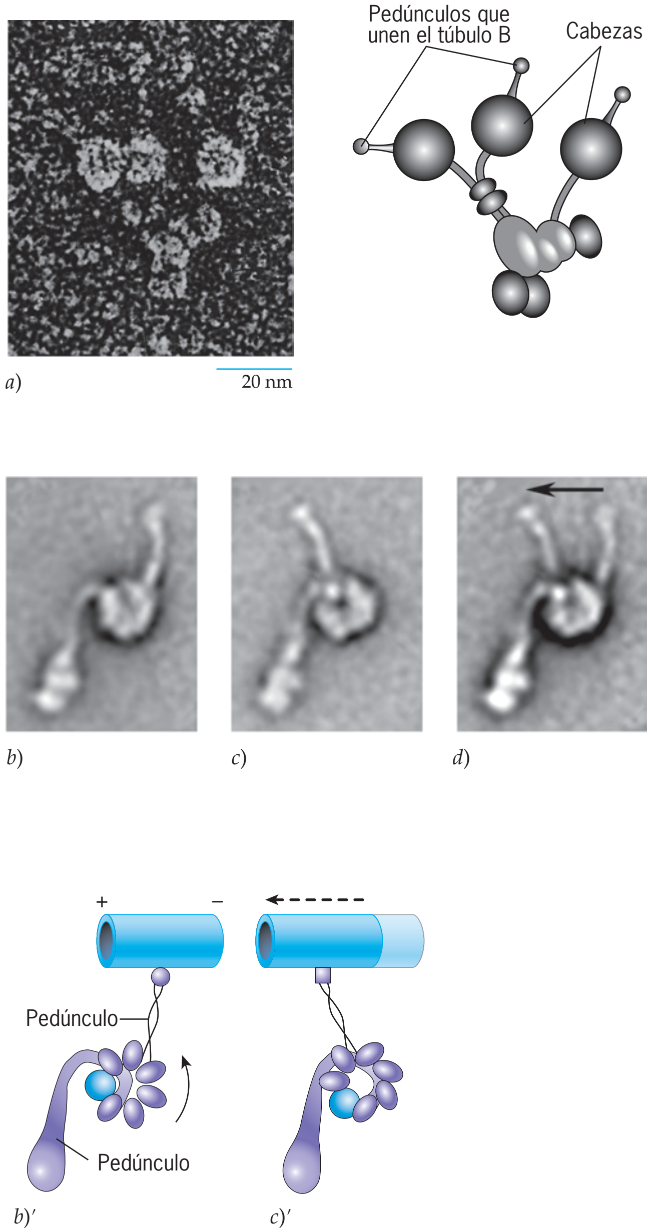



**FIGURA 9-30 Modelo de la estructura y la función de la dineína flagelar o ciliar.** *a*) Réplica de platino de una molécula de dineína de brazo externo flagelado con sombra rotatoria preparada mediante microscopía electrónica de grabado profundo y congelación rápida. Cada una de las tres cadenas pesadas forma una prominente cabeza globular con una extensión (pedúnculo) que funciona al unir el brazo de dineína con el doblete vecino. Un dibujo interpretativo se muestra a la derecha. *b-d*) Micrografías de alta resolución (con los modelos interpretativos b′, c′ a continuación) de una cadena pesada de dineína flagelar antes (*b*) y después (*c*) de su carrera de poder. El dominio del motor, que consiste en una serie de módulos dispuestos en una rueda, se ve que ha girado, lo que ha provocado que el pedúnculo se mueva hacia la izquierda. La imagen que se muestra en *d*) es un compuesto de moléculas que muestra la posición del pedúnculo antes y después del golpe de poder. La carrera de potencia hace que los microtúbulos unidos a la punta del pedúnculo se deslicen 15 nm hacia la izquierda con respecto al dominio del motor. Los ensayos de motilidad *in vitro* sugieren que la dineína puede ser capaz de “cambiar de marcha” para que pueda tomar pasos más cortos y potentes a medida que mueve una carga de masa en aumento. (*Nota:* Un modelo alternativo de función dineína se discute en Science 2008;322:1647.)

FUENTE: *a*) Cortesía de John E Heuser y Ursula W. Goodenough; *b*) De Stan A Burgess, M. L. Walker, M Sakakiara, P. J. Knight, y K Oiwa. *Nature* 2003;421:717, fig. 4. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers, Ltd.

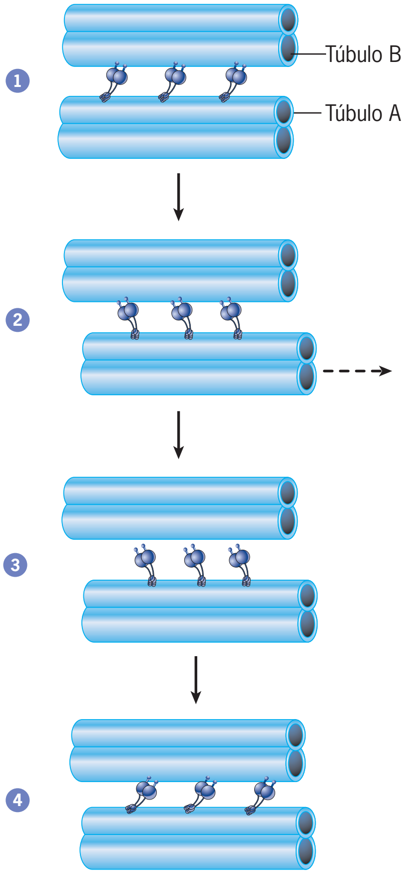



**FIGURA 9-31 Representación esquemática de las fuerzas que impulsan la movilidad ciliar o flagelar.** Los pasos se describen en el texto. En la figura anterior se muestra una representación real de la carrera de potencia.

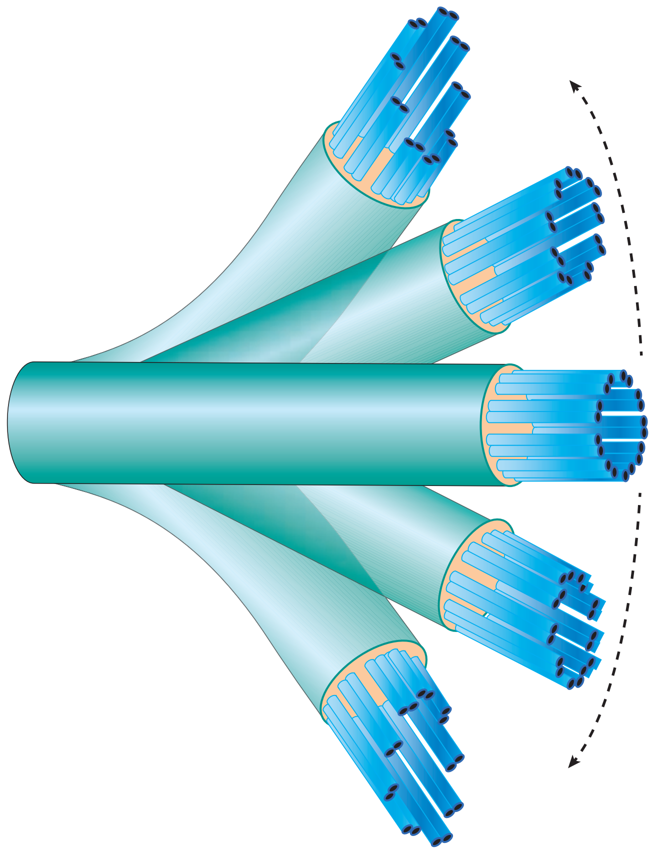


**FIGURA 9-32 El mecanismo de microtúbulos deslizantes de la motilidad ciliar o flagelar.** Diagrama esquemático del deslizamiento de los microtúbulos vecinos uno respecto al otro. Cuando el cilio es recto, todos los dobletes externos terminan en el mismo nivel (*centro*). La flexión del cilio ocurre cuando los dobletes en el lado interno de la curva se deslizan más allá de los que están en el lado externo (arriba y abajo). El movimiento de los brazos de dineína responsables del deslizamiento de los microtúbulos vecinos se mostró en las figuras anteriores.

FUENTE: De D. Voet y J. G. Voet. *Biochemistry* 1995;2E:1258; Copyright John Wiley and Sons, Inc. Reproducida con permiso de John Wiley and Sons, Inc.

opuesto del axonema. Una gran pregunta abierta en el campo de los cilios es qué mecanismo coordina el movimiento de miles de brazos de dineína durante el ciclo de latido ciliar. El par central contribuye a esta coordinación al señalar los brazos de dineína a través de los radios radiales; sin embargo, la motilidad aún es posible en los flagelos mutantes que carecen del par central, argumentando que las actividades del brazo de dineína pueden autoorganizarse de alguna manera que permanezca determinada.

### REPASO

1. Contraste las funciones sensoriales y móviles de cilios y flagelos. Describa cómo las fallas de estas diferentes funciones ciliares contribuyen a las enfermedades humanas.

## 9.8 PERSPECTIVA HUMANA

### El papel de los cilios en el desarrollo y las enfermedades

Damos por hecho que las enfermedades son el resultado de la falla de órganos específicos dentro de nuestro cuerpo, pero ¿qué ocurre con la falla de organelos específicos dentro de nuestras células? Una clase de enfermedades recientemente descubierta causada por la disfunción del organelo son las ciliopatías, un conjunto de síntomas de enfermedad aparentemente no relacionados que resultan de defectos en los cilios. Muchas de estas enfermedades se conocían desde hace tiempo, pero nadie había adivinado que podrían tener algo que ver con los cilios. De hecho, durante mucho tiempo se pensó que la mayoría de los cilios en el cuerpo no desempeñaban ninguna función importante y que quizás eran puramente vestigiales. Puede parecer sorprendente que un organelo presente en casi todas las células del cuerpo pueda considerarse sin importancia o vestigial, pero esta idea surgió porque los cilios en la mayoría de las células no son móviles, y se asumió que la motilidad era su función clave.

El descubrimiento esencial que desbloqueó el campo de la enfermedad de los cilios surgió de un descubrimiento básico en la biología celular, a saber, la identificación del sistema de transporte intraflagelar como se discutió en el texto principal. Cuando

(*continúa*)

los investigadores que estudiaban el ensamblaje flagelar en *Chlamydomonas* comenzaron a determinar la secuencia proteica de las proteínas IFT aisladas del flagelo *Chlamydomonas*, descubrieron que una de las proteínas clave del IFT, IFT88, estaba codificada por un gen ya conocido en el mundo de la enfermedad renal. Este gen, originalmente llamado Tg737, se encontró en un proyecto de mutagénesis de ratón al azar, y las mutaciones en Tg737 causaron enfermedades renales poliquísticas (PKD, *polycystic kidney diseases*) autosómicas recesivas. La PKD es una causa importante de insuficiencia renal en adultos y afecta a millones de personas cada año en todo el mundo. Las principales características de la PKD son los riñones muy agrandados repletos de quistes llenos de líquido (véase **FIGURA 1**). Aunque el gen Tg737 había sido identificado muchos años antes, no se sabía nada sobre la función de su producto proteico hasta que los estudios básicos de flagelos en un organismo modelo unicelular produjeron la primera información molecular sobre el sistema IFT. El hecho de que un gen implicado en el ensamblaje de los cilios pueda desempeñar un papel en la enfermedad renal sugiere que los cilios podrían no ser tan rudimentarios después de todo. Otros estudios indicaron que los cilios en los conductos colectores del riñón (figura 9-23*a*) actúan como sensores de flujo para controlar el flujo de la orina, y cuando esta señalización de flujo es defectuosa, se desarrollan quistes que conducen finalmente a insuficiencia renal. La importancia de estos cilios se reforzó cuando se descubrió que un par de proteínas de membrana llamadas policistina 1 y 2 (PC1 y PC2) se localizan en la superficie de estos cilios renales. PC1 y PC2 forman un complejo en el que PC1 sirve como sensor para el flujo de fluido en los túbulos renales y PC2 sirve como un canal de iones $Ca^{2+}$ asociado. Las mutaciones en PKD1 y PKD2, los genes que codifican PC1 y PC2, conducen a una enfermedad renal poliquística similar a la que se observa cuando es defectuosa. Sobre la base de estos estudios, ahora se reconoce que la enfermedad renal poliquística es en última instancia una enfermedad de los cilios.

Pero la PKD era solo la punta del iceberg. Un número grande y aún creciente de enfermedades parece implicar defectos en los cilios en diferentes tejidos del cuerpo.

Un buen ejemplo es el síndrome de Bardet-Biedl (BBS, *Bardet-Biedl syndrome*), causado por mutaciones en cualquiera de una serie de genes que afectan el tránsito de proteínas hacia los cilios. Las personas afectadas con BBS exhiben una notable gama de anomalías, que incluyen la polidactilia (tener más dedos en las manos, o tener más dedos en los pies), la obesidad, la enfermedad renal, el retraso mental y anormalidades genitales. Se cree que estos síntomas dispares reflejan la función de los cilios como antenas para recibir señales que regulan el desarrollo y la fisiología. Por ejemplo, la polidactilia observada en BBS y otras ciliopatías ocurre porque se requieren cilios para la señalización por la vía de señalización del desarrollo del erizo. El hecho de que todas estas disfunciones se puedan rastrear hasta las anomalías en los cilios ilustra la gran importancia de estas estructuras celulares en el desarrollo y la función de los órganos.

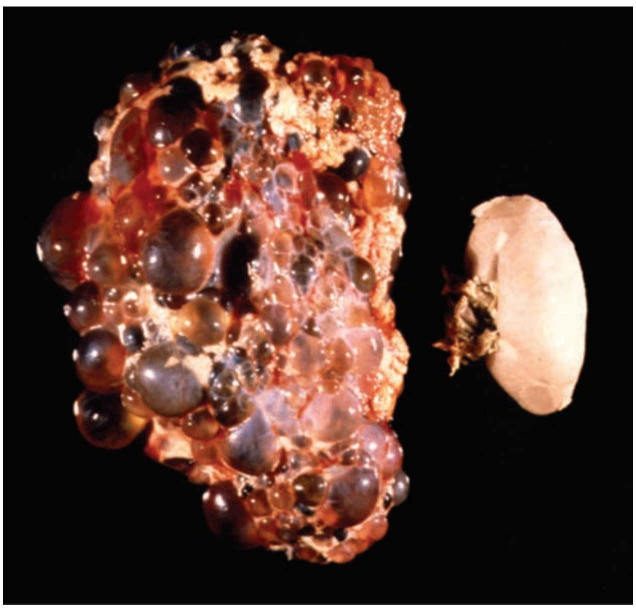


**FIGURA 1 Los cilios primarios defectuosos en el riñón conducen a la enfermedad renal poliquística.** La imagen muestra un riñón normal a la izquierda y un riñón poliquístico a la derecha.

FUENTE: Imagen cortesía de la Fundación PKD, pkdcure.org

Muchas ciliopatías como PKD o BBS involucran funciones sensoriales de cilios no móviles, pero también hay serias consecuencias para la salud relacionadas con los cilios móviles. Los cilios mueven el moco en las vías respiratorias, así como el oviducto y el líquido cefalorraquídeo en los ventrículos del cerebro. Los defectos en las funciones móviles de estos cilios, causados, por ejemplo, por mutaciones en dineínas ciliares o rayos radiales, pueden conducir a bronquiectasias, sinusitis crónica en el caso de las vías respiratorias e hidrocefalia en el caso del cerebro. Todos estos síntomas aparentemente son el resultado de la pérdida del flujo de líquido impulsado por cilios. Un síntoma sorprendente que ocurre en aproximadamente la mitad de todos los pacientes con cilios no móviles es el *situs inversus*, una reversión completa de la asimetría izquierda-derecha de los órganos internos. Cuando lo miras en un espejo, ves un organismo relativamente simétrico, uno cuya mitad izquierda es esencialmente una imagen especular de la mitad derecha. Los cirujanos, por otro lado, ven un organismo sorprendentemente asimétrico cuando abren la cavidad torácica o abdominal de una persona. El estómago, el corazón y el bazo, por ejemplo, se desplazan hacia el lado izquierdo del cuerpo, mientras que el hígado está en gran parte del lado derecho. En ocasiones, un médico verá a un paciente en el que se invierte la asimetría izquierda-derecha de los órganos viscerales (una condición llamada *situs inversus*). Este parece ser el resultado de defectos en los cilios móviles que se encuentran en el embrión en el momento de la gastrulación. Estos cilios embrionarios dirigen un flujo dirigido hacia la izquierda de líquido extraembrionario, y este flujo dirigido determina qué lado del embrión será el lado izquierdo frente al lado derecho. Cuando el flujo está ausente, la decisión izquierda-derecha se realiza al azar, por lo que la mitad de dichos pacientes desarrollan *situs inversus*. La importancia del flujo se demostró tomando embriones de ratón con cilios no móviles y usando una bomba para impulsar un flujo creado artificialmente sobre su superficie. Cuando el flujo fue dirigido hacia la izquierda, los ratones desarrollaron posiciones normales de órganos, y cuando el flujo se dirigió hacia la derecha, los ratones desarrollaron *situs inversus*. Esto explica por qué la falta de motilidad conduce al *situs inversus*, pero plantea la cuestión de cómo los tejidos en desarrollo detectan la dirección del flujo para determinar la izquierda *versus* la derecha. Sorprendentemente, resulta que el flujo impulsado por cilios en el embrión que rompe la simetría izquierda-derecha es detectado por las mismas proteínas de policistina que detectan el flujo de fluido en el riñón. En el caso del embrión, estos cilios sensores de flujo están ubicados en un anillo alrededor del parche de células que contienen cilios móviles, y la dirección del flujo a través de este parche determina que las células que rodean el parche se activen a través de los canales de policistina.

El descubrimiento de las ciliopatías ha abierto una nueva puerta para comprender el papel funcional de los cilios en el desarrollo y la fisiología. Muchos de los genes responsables de estas diversas ciliopatías se identificaron por primera vez en organismos modelo como *Chlamydomonas* o *C. elegans*, lo que proporciona otro ejemplo de la importancia de la investigación básica sobre organismos no vertebrados para fomentar nuestra comprensión de las enfermedades humanas.

## 9.9 Filamentos intermedios

El segundo de los tres principales elementos del citoesqueleto que se debatirán se observó en el microscopio electrónico como filamentos sólidos no ramificados con un diámetro de 10-12 nm. Ellos fueron nombrados filamentos intermedios (o IF, *intermediate filaments*). Hasta la fecha, los filamentos intermedios solo se han identificado en células animales. Los filamentos intermedios son fibras fuertes, flexibles y similares a los cables que proporcionan resistencia mecánica a las células que están sometidas a estrés físico, incluidas las neuronas, las células musculares y las células epiteliales que recubren las cavidades del cuerpo. A diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos, los IF son un grupo de estructuras químicamente heterogéneas que, en humanos, están codificadas por aproximadamente 70 genes diferentes. Las subunidades polipeptídicas de las IF pueden dividirse en cinco clases principales según el tipo de célula en el que se encuentran (tabla 9.2), así como los criterios bioquímicos, genéticos e inmunológicos. Restringiremos la presente discusión a las clases I-IV, que se encuentran en la construcción de filamentos citoplasmáticos, y consideraremos las IF tipo V (las láminas), que están presentes como parte del revestimiento interno de la envoltura nuclear, en la sección 12.2. Los IF irradian a través del citoplasma de una amplia variedad de células animales y con frecuencia están interconectados a otros filamentos del citoesqueleto mediante puentes cruzados delgados y delgados (**FIGURA 9-33**). En muchas células, estos puentes cruzados consisten en una proteína dímera alargada llamada plectina que puede existir en numerosas isoformas. Cada molécula de plectina tiene un sitio de unión para un filamento intermedio en un extremo y, dependiendo de la isoforma, un sitio de unión para otro filamento intermedio, microfilamento o microtúbulo en el otro extremo.

Aunque los polipéptidos IF tienen diversas secuencias de aminoácidos, todos comparten una organización estructural similar que les permite formar filamentos de aspecto similar. Lo más notable es que los polipéptidos de las IF contienen un dominio central, en forma de varilla, alfahelicoidal de longitud similar y secuencia de aminoácidos homóloga. Este largo dominio fibroso hace que las subunidades de los filamentos intermedios sean muy diferentes de las tubulinas globulares y las subunidades de actina de los microtúbulos y los filamentos de actina. El dominio fibroso central está flanqueado en cada lado por dominios globulares de tamaño y secuencia variables (paso 1, **FIGURA 9-34**). Dos de estos polipéptidos interactúan espontáneamente cuando sus varillas helicoidales alfa se envuelven una alrededor de la otra para formar un dímero similar a un cordaje de aproximadamente 45 nm de longitud (paso 2). Debido a que los dos polipéptidos están alineados paralelos entre sí en la misma orientación, el dímero tiene polaridad, con un extremo definido por los extremos C de los polipéptidos y el extremo opuesto por sus extremos N terminales.

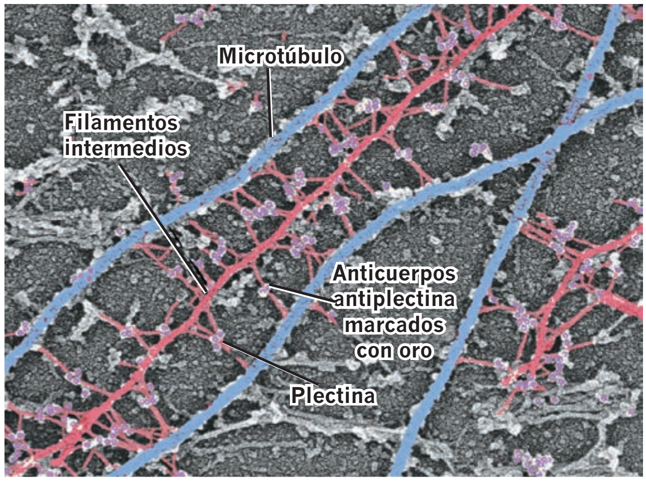



**FIGURA 9-33 Los elementos del citoesqueleto están conectados entre sí por puentes cruzados de proteínas.** Microfotografía electrónica de una réplica de una pequeña porción del citoesqueleto de un fibroblasto después de la eliminación selectiva de los filamentos de actina. Los componentes individuales se han digitalizado para ayudar a la visualización. Se ve que los filamentos intermedios (azul) están conectados a los microtúbulos (rojo) por puentes cruzados largos y delgados que consisten en la proteína fibrosa plectina (verde). La plectina se localiza por anticuerpos unidos a partículas de oro coloidal (amarillo).

FUENTE: Cortesía de Tatyana Svitkina y Gary Borisy.

**TABLA 9-2 Propiedades y distribución de las principales proteínas de filamentos intermedias de los mamíferos**

| Proteína IF | Tipo de secuencia | Distribución de tejido primario |
|---|---|---|
| Queratina (ácida) (28 polipéptidos diferentes) | I | Epitelios |
| Queratina (básica) (26 polipéptidos diferentes) | II | Epitelios |
| Vimentina | III | Células mesenquimales |
| Desmina | III | Músculo |
| Proteína ácida fibrilar Glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) | III | Astrocitos |
| Periferina | III | Neuronas periféricas |
| Proteínas neurofilamentosas | | Neuronas de nervios centrales y periféricos |
| NF-L | IV | |
| NF-M | IV | |
| NF-H | IV | |
| Nestin | IV | Neuroepitelia |
| Proteínas de láminas | | Todos los tipos de células (sobres nucleares) |
| Lámina A | V | |
| Lámina B | V | |
| Lámina C | V | |

Se pueden encontrar tablas más detalladas en *Trends Biochem Sci* 2006;31:384, *Genes and Development* 2007;21:1582, y *Trends Cell Biol* 2008;18:29.

### Montaje y desmontaje de los filamentos intermedios

Se cree que el bloque de construcción básico del ensamblaje de los IF es un tetrámero en forma de varilla, formado por dos dímeros que se alinean lado a lado de forma escalonada con sus extremos N y C apuntando en direcciones opuestas (antiparalelas), como se muestra en la figura 9-34, el paso 3 y en la figura 9-34*b*. Debido a que los dímeros apuntan en direcciones opuestas, el tetrámero en sí carece de polaridad. Estudios recientes del autoensamblaje de los IF *in vitro* sugieren que ocho tetrámeros se asocian entre sí en una disposición lado a lado (lateral) para formar un filamento que tiene una unidad de longitud (aproximadamente 60 nm) (paso 4). El posterior crecimiento del polímero se logra cuando estas longitudes unitarias de filamentos se asocian entre sí en una forma de extremo a extremo para formar el filamento intermedio altamente alargado (etapa 5). No se cree que ninguno de estos pasos de ensamblaje requiera la participación directa de ATP o GTP. Debido a que los bloques de construcción tetraméricos carecen de polaridad, también lo hace el filamento ensamblado, que es otra característica importante que distingue los IF de otros elementos del citoesqueleto.

Los filamentos intermedios tienden a ser menos sensibles a los agentes químicos que otros tipos de elementos del citoesqueleto y son más difíciles de solubilizar. De hecho, el tratamiento de una celda con detergentes iónicos extrae casi todo menos los filamentos intermedios de la célula. Debido a su insolubilidad, ini-

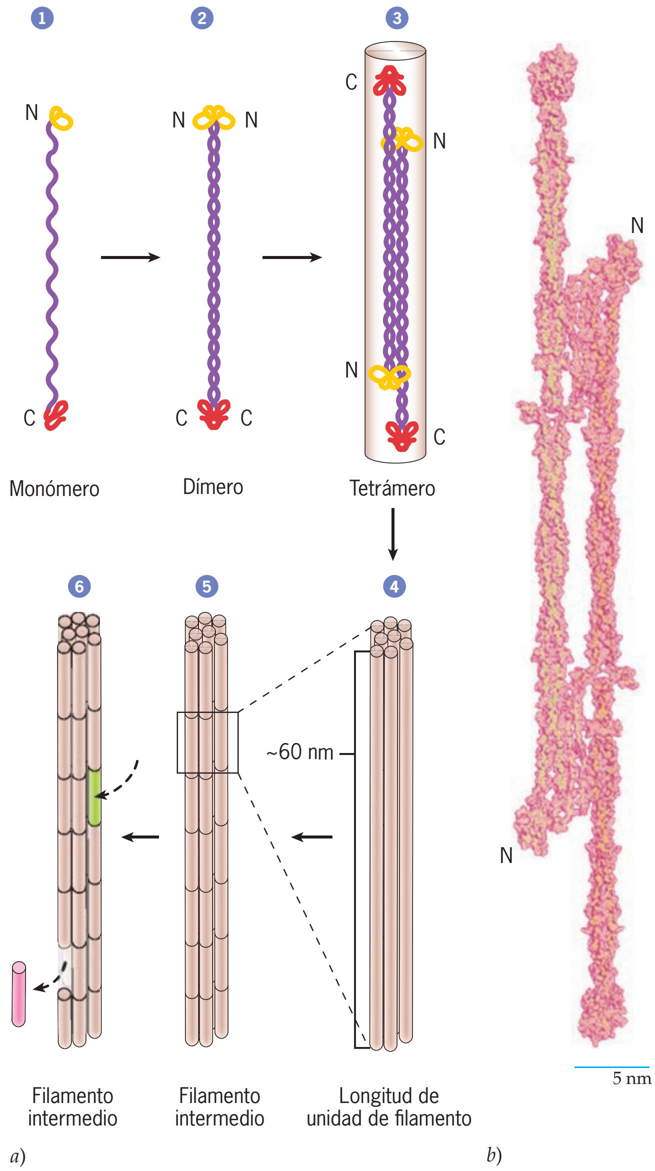



**FIGURA 9-34** Un modelo de conjunto y arquitectura de los filamentos intermedios. Cada monómero tiene un par de dominios terminales globulares (rojo o amarillo) separados por una larga región alfahelicoidal (paso 1). Los pares de monómeros se asocian en orientación paralela con sus extremos alineados para formar dímeros (paso 2). Dependiendo del tipo de filamento intermedio, los dímeros pueden estar compuestos de monómeros idénticos (homodímeros) o monómeros no idénticos (heterodímeros). Los dímeros a su vez se asocian de forma antiparalela y escalonada para formar tetrámeros (paso 3), que se piensa que son la subunidad básica en el ensamblaje de los filamentos intermedios. En el modelo que se muestra aquí, 8 tetrámeros se asocian lateralmente para formar una longitud unitaria del filamento intermedio (paso 4). A continuación, se forman filamentos intermedios altamente alargados a partir de la asociación de extremo a extremo de estas longitudes de unidad (paso 5). Una vez formados, los filamentos intermedios experimentan un proceso de remodelación dinámica que se cree que implica la intercalación de longitudes unitarias de filamento en el cuerpo de un filamento existente (paso 6). b) Un modelo de un tetrámero de la proteína IF vimentina.

FUENTE: De Anna A Sokolova, *et al*. Cortesía de Sergei V Strelkov. *PNAS* 2006;103:16209, fig. 3a. © 2006 National Academy of Sciences, Estados Unidos.

cialmente se pensó que las IF eran estructuras permanentes e invariables, por lo que fue una sorpresa descubrir que se comportaran dinámicamente *in vivo*. Cuando las subunidades de queratina marcadas se inyectan en las células de la piel cultivadas, se incorporan rápidamente a las IF existentes. De modo sorprendente, las subunidades no se incorporan en los extremos del filamento, como podría haberse esperado por analogía con el conjunto de microtúbulos y filamentos de actina, sino más bien en el interior del filamento (**FIGURA 9-35*a***).

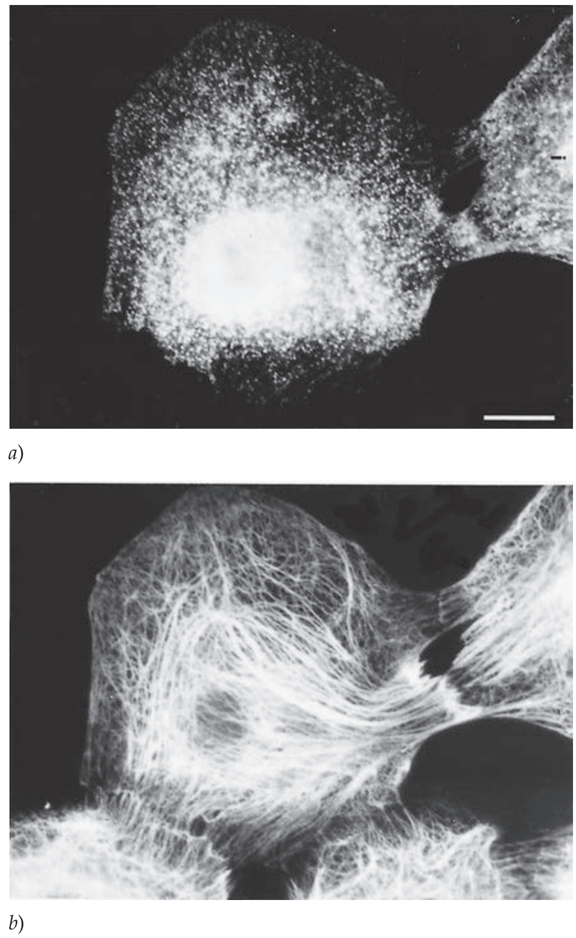


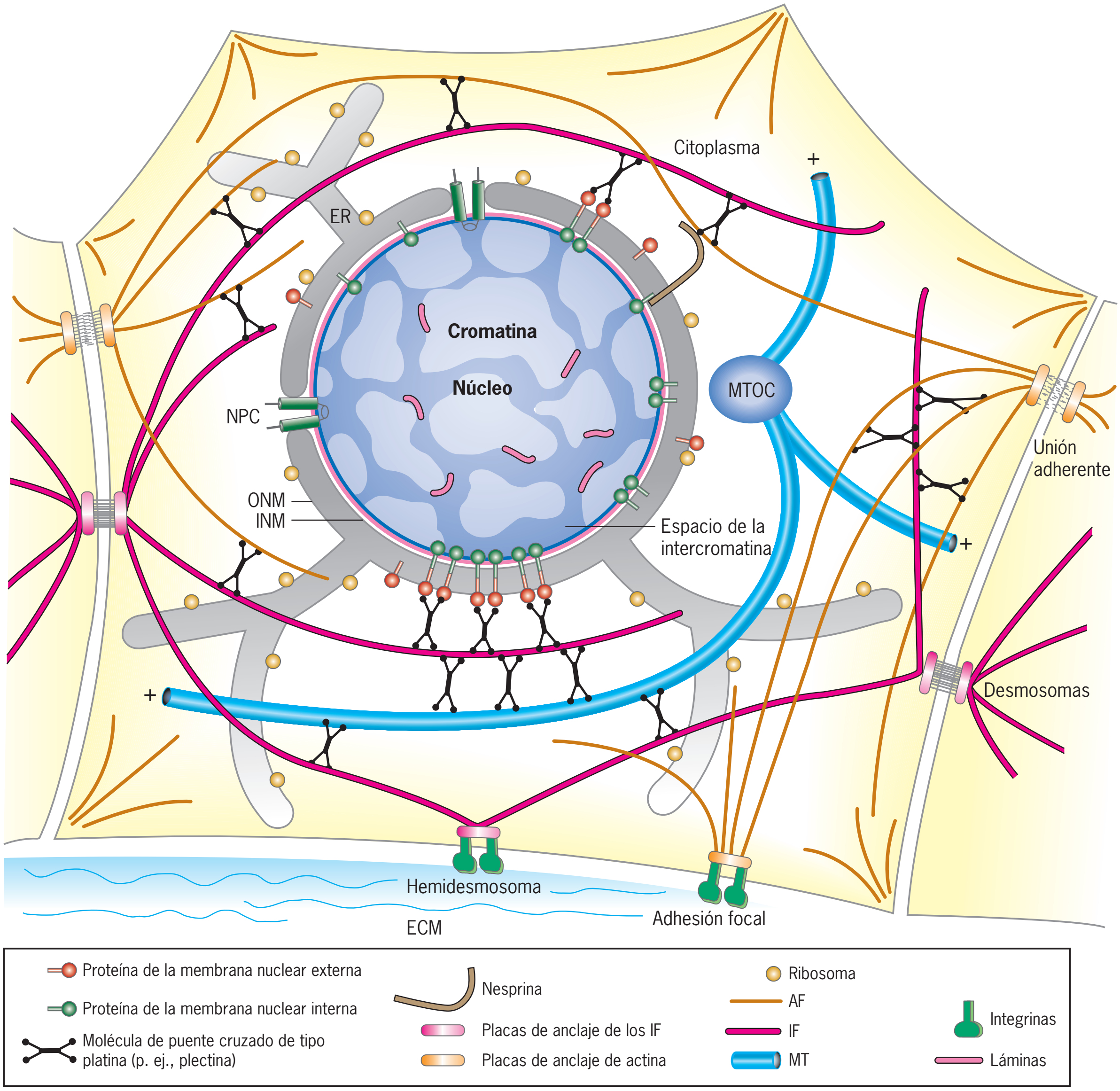

**FIGURA 9-35 Demostración experimental del carácter dinámico de los filamentos intermedios.** Estas fotografías muestran los resultados de un experimento en el que la queratina tipo I marcada con biotina se microinyectó en células epiteliales cultivadas y se localizó 20 minutos más tarde usando inmunofluorescencia. La fotografía en *a* muestra la localización de la queratina biotinilada inyectada (según lo revelado por anticuerpos fluorescentes antibiotina) que se había incorporado a los filamentos durante el período de 20 minutos siguiente a la inyección. La fotografía muestra la distribución de los filamentos intermedios en la célula según lo revelan los anticuerpos antiqueratina. El patrón de fluorescencia en forma de punto indica que las subunidades inyectadas se incorporan a los filamentos existentes en los sitios a lo largo de su longitud, en lugar de en sus extremos. (Compárese con un experimento similar con tubulina marcada en la figura 9-26.) Barra, 10 µm.

FUENTE: de Rita K Miller, Karen Vikstrom, y Robert D Goldman. *J Cell Biol* 1991;113:848, fig. 4. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

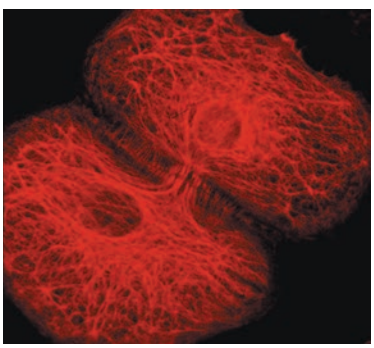
Los resultados representados en la figura 9-35 pueden reflejar el intercambio de longitudes de unidad de filamento directamente en una red de IF existente (como se muestra en el paso 6, figura 9-34*a*). A diferencia de los otros dos elementos principales del citoesqueleto, el ensamblaje y el desmontaje de los IF se controlan principalmente por fosforilación y desfosforilación de las subunidades. Por ejemplo, la fosforilación de los filamentos de vimentina por la proteína quinasa A conduce a su desensamblaje.

## Tipos y funciones de filamentos intermedios

Los filamentos de queratina constituyen las proteínas estructurales primarias de las células epiteliales (incluidas las células epidérmicas, los hepatocitos hepáticos y las células acinares pancreáticas). La **FIGURA 9-36*a*)** muestra una vista esquemática de la




*a*)



*b*)

**FIGURA 9-36 La organización de filamentos intermedios (IF) dentro de una célula epitelial.** *a*) En este dibujo esquemático, se ve que las IF irradian a través de la célula, estando ancladas tanto en la superficie externa del núcleo como en la superficie interna de la membrana plasmática. Las conexiones al núcleo se realizan a través de proteínas que atraviesan las membranas de la envoltura nuclear y la membrana plasmática a través de sitios especializados de adhesión, como desmosomas y hemidesmosomas. También se ve que los IF están interconectados con los otros dos tipos de fibras del citoesqueleto. Las conexiones a microtúbulos (MT, *microtubules*) y filamentos de actina (AF, *actin filaments*) están hechas principalmente por miembros de la familia de proteínas plaquinas, como la molécula de plectina dimérica que se muestra en la figura 9-41. *b*) Distribución de filamentos intermedios que contienen queratina en células de piel cultivadas (queratinocitos). Se ve que los filamentos forman una red similar a una cápsula alrededor del núcleo y también se extienden a la periferia de la célula.

FUENTE: *a*) Reproducida con permiso de H Herrmann, *et al*. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2007;8:564; Copyright 2007, Macmillan Magazines Ltd. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* por Nature Publishing Group. Reproducida con permiso de Nature Publishing Group en el formato de diario a través de copyright clearance center; *b*) De Pierre A Coulombe y M Bishr Omary. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:111, con permiso de Elsevier.

disposición espacial de los filamentos de queratina de una célula epitelial generalizada, y la figura 9-36*b* muestra la disposición real dentro de un par de células epidérmicas cultivadas. Los IF que contienen queratina irradian a través del citoplasma, se unen a la envoltura nuclear en el centro de la célula y se anclan en el borde externo de la célula mediante conexiones a las placas citoplásmicas de desmosomas y hemidesmosomas (sección 7.9). La figura 9-36*a* también representa las interconexiones entre los IF y los microtúbulos de la célula y los filamentos de actina, que transforma estos elementos por lo demás separados en un citoesqueleto integrado. Debido a estas diversas conexiones físicas, la red IF puede servir como andamio para organizar y mantener la arquitectura celular y para absorber las tensiones mecánicas aplicadas por el entorno extracelular.

El citoplasma de las neuronas contiene paquetes de filamentos intermedios cuyos ejes largos están orientados paralelamente al del axón (véase figura 9-7*b*). Estos IF, o **neurofilamentos**, como se les llama, están compuestos por tres proteínas distintas: NF-L, NF-H y NF-M, todos del grupo de tipo IV de la tabla 9.2. A diferencia de los polipéptidos de otros IF, NF-H y NF-M tienen

armas laterales que se proyectan hacia afuera desde el neurofilamento. Se cree que estas armas laterales mantienen el espacio adecuado entre los neurofilamentos paralelos del axón (véase figura 9-7*b*). En las primeras etapas de diferenciación cuando el axón está creciendo hacia una célula blanco, contiene muy pocos neurofilamentos pero un gran número de microtúbulos de soporte. Una vez que la célula nerviosa se ha extendido por completo, se llena de neurofilamentos que brindan apoyo a medida que el axón aumenta drásticamente su diámetro. La agregación de NF se observa en varios trastornos neurodegenerativos humanos, que incluyen ALS y la enfermedad de Parkinson. Estos agregados de NF pueden bloquear el transporte axonal, lo que lleva a la muerte de las neuronas.



Los esfuerzos para sondear la función de los IF se han basado en gran medida en ratones con bloqueo génico que no producen un polipéptido IF particular (un gen *knockout*) o producen un polipéptido IF alterado. Estos estudios han revelado la importancia de los filamentos intermedios en tipos de células particulares. Por ejemplo, los ratones que llevan deleciones en el gen que codifica K14, un polipéptido de queratina tipo I normalmente sintetizado por las células de la capa epidérmica basal, tienen serios problemas de salud. Estos ratones son tan sensibles a la presión mecánica que incluso los traumatismos leves, como los que ocurren durante el paso por el canal de parto o durante la lactancia del recién nacido, pueden causar ampollas severas en la piel o la lengua. Este fenotipo tiene una gran semejanza con una rara enfermedad que causa ampollas en la piel en humanos, llamada epidermolisis ampollosa simple (EBS, *epidermolysis bullosa simplex*).[3] El análisis posterior de pacientes con EBS ha demostrado que llevan mutaciones en el gen que codifica el polipéptido K14 homólogo (o el polipéptido K5, que forma dímeros con K14). Estos estudios confirman el papel de los IF en la impartición de resistencia mecánica a las células situadas en las capas epiteliales. De forma similar, los ratones con bloqueo génico que no producen el polipéptido desmina presentan anomalías serias del corazón y el músculo esquelético. La desmina juega un papel estructural clave en el mantenimiento de la alineación de las miofibrillas de una célula muscular, y la ausencia de estas IF hace que las células sean extremadamente frágiles. Una enfermedad humana hereditaria, llamada miopatía relacionada con la desmina, es causada por mutaciones en el gen que la codifica. Las personas con este trastorno sufren de debilidad del músculo esquelético, arritmias cardiacas y eventual insuficiencia cardiaca congestiva. No todos los polipéptidos IF tienen tales funciones esenciales. Por ejemplo, los ratones que carecen del gen de vimentina, que se expresa en fibroblastos, macrófagos y glóbulos blancos, muestran anormalidades relativamente menores, aunque las células afectadas carecen de IF citoplasmáticas. Es evidente a partir de estos estudios que las IF tienen funciones específicas de tejido, que son más importantes en algunas células que en otras.

[3] Como se mencionó en el capítulo 7, los tipos similares de enfermedades ampollosas pueden ser causados por defectos en las proteínas del hemidesmosoma, que mantiene la capa basal de la epidermis en la membrana basal. La EBS también puede ser causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína p de la reticulación de IF, pero tales pacientes también sufren de distrofia muscular de inicio tardío, lo que demuestra la importancia de las redes de FI tanto en los músculos como en la piel.

**REPASO**

1. Dé algunos ejemplos que refuercen la sugerencia de que los filamentos intermedios son importantes principalmente en funciones específicas de tejido en lugar de en actividades básicas que son comunes a todas las células.
2. Compare y contraste el conjunto de microtúbulos y el conjunto de filamentos intermedios.

## 9.10 La actina

Las células son capaces de tener una movilidad notable. Las células de la cresta neural en un embrión de vertebrados abandonan el sistema nervioso en desarrollo y migran a todo el ancho del embrión, formando productos tan diversos como las células pigmentarias de la piel, los dientes y el cartílago de las mandíbulas (véase figura 7-11). Legiones de glóbulos blancos patrullan los tejidos del cuerpo en busca de restos y microorganismos. Ciertas partes de las células también pueden ser móviles; amplias proyecciones de células epiteliales en el borde de una herida actúan como dispositivos móviles que tiran de la hoja de células sobre el área dañada, sellando la herida. De manera similar, el borde de ataque de un axón en crecimiento envía procesos microscópicos que examinan el sustrato y guían a la célula hacia un objetivo sináptico. Todos estos diversos ejemplos de motilidad comparten al menos un componente: todos dependen de la actina, el tercer tipo principal de elemento del citoesqueleto. La **actina** también está involucrada en procesos móviles intracelulares, como el movimiento de vesículas, la fagocitosis y la citoquinesis. De hecho, las células vegetales se basan principalmente en actina, en lugar de microtúbulos, para servir como pistas para el transporte a larga distancia de vesículas citoplásmicas y organelos. Este sesgo hacia la motilidad basada en la actina refleja la distribución más bien restringida de los microtúbulos en muchas células vegetales (véase figura 9-6). La actina también juega un papel importante en la determinación de las formas de las células y puede proporcionar un soporte estructural para varios tipos de proyecciones celulares (como en la figura 9-66).

### Estructuras de la actina

Los filamentos de actina tienen aproximadamente 8 nm de diámetro y están compuestos por subunidades globulares de la proteína actina, que es la proteína más abundante en la mayoría de las células. En presencia de ATP, los monómeros de actina se polimerizan para formar un filamento helicoidal flexible. Como resultado de su organización de subunidades (**FIGURA 9-37*a***), un filamento de actina es esencialmente una estructura de dos hebras con dos ranuras helicoidales que corren a lo largo de su longitud (figura 9-37*b*). Los términos *filamentos de actina, actina-F* y *microfilamentos* son básicamente sinónimos para este tipo de filamento. Dependiendo del tipo de célula y la actividad en la que se activa, los filamentos de actina se pueden organizar en matrices ordenadas, redes muy ramificadas o haces fuertemente anclados.

Todos los monómeros dentro de un filamento de actina apuntan en la misma dirección, dando como resultado un filamento polar con los denominados extremos "puntiagudos" y "con púas". Esta convención de nomenclatura se originó a partir de una técnica utilizada para identificar y etiquetar los filamentos de actina en preparación para el microscopio electrónico. Este método utilizó la capacidad de un proteolítico fragmento de miosina, llamado S1 (véase figura 9-41), para unirse fuertemente y "decorar" los lados de los filamentos de actina. Cuando los fragmentos S1 están unidos, un extremo del filamento de actina aparece puntiagudo como una punta de flecha (el extremo "puntiagudo"), mientras que el otro extremo se ve con púas. Un ejemplo de esta "decoración" de punta de flecha se muestra en las microvellosidades de las células epiteliales intestinales de la **FIGURA 9-38**. S1 ha demostrado ser útil para la identificación y la caracterización de filamentos de actina utilizando la micrografía electrónica. Al usar microscopía óptica, la actina puede identificarse con facilidad y localizarse usando faloidina marcada fluorescentemente (figura 9-66*a*), una sustancia química que se une a los lados de los filamentos de actina o mediante el uso de anticuerpos antiactina marcados fluorescentemente.

La actina fue identificada hace más de 50 años como una de las principales proteínas contráctiles de las células musculares.

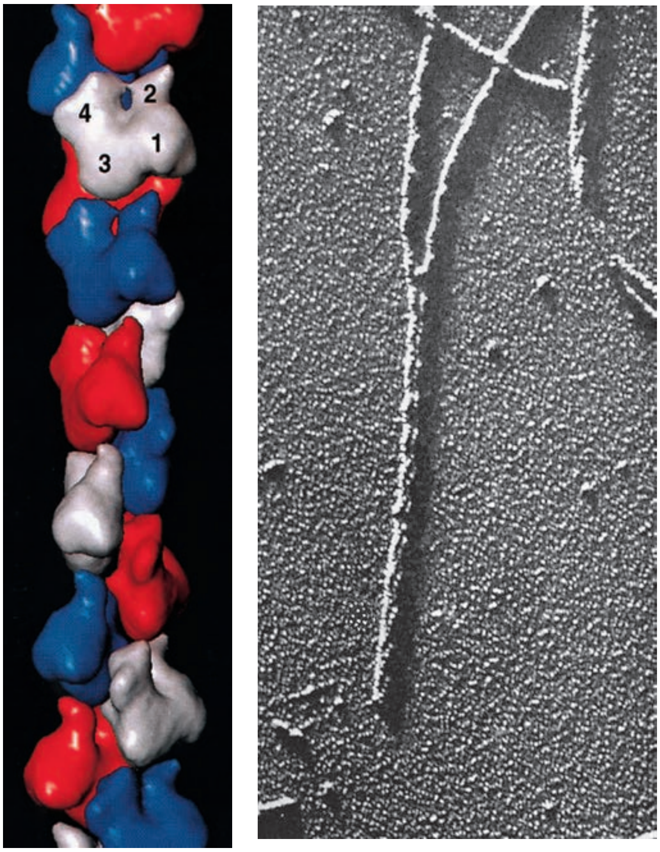



**FIGURA 9-37 Estructura del filamento de actina.** *a*) Un modelo de un filamento de actina. Las subunidades de actina se representan en tres colores para distinguir las subunidades consecutivas más fácilmente. Los subdominios en una de las subunidades de actina están etiquetados como 1, 2, 3 y 4 y la hendidura de unión al ATP en cada subunidad es evidente. Los filamentos de actina tienen polaridad, que se denota como un extremo positivo y negativo. La hendidura (en la subunidad roja superior) está presente en el extremo menos del filamento. *b*) Microfotografía electrónica de una réplica de un filamento de actina que muestra su arquitectura de doble hélice.

FUENTE: *a*) De Michael F. Schmid, *et al*. Cortesía de Wah Chiu, *J Cell Biol* 1994;124:346, Fig. 4. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *b*) De Robert H Depue, Jr y Robert V Rice. *J Mol Biol* 1965;12:302. Reproducida con permiso de Elsevier.

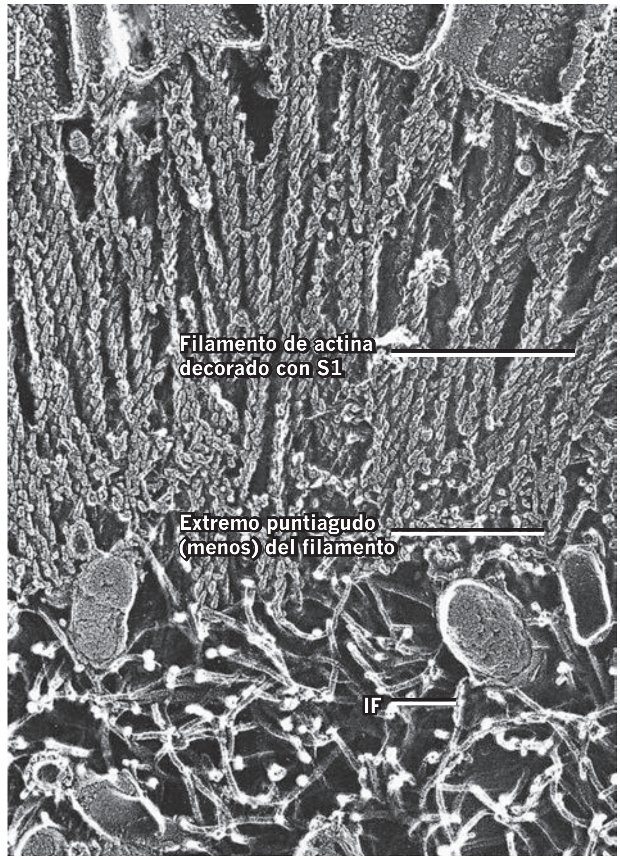



**FIGURA 9-38 Determinación de la ubicación y polaridad de los filamentos de actina usando la subunidad S1 de la miosina.** Microfotografía electrónica de una réplica que muestra los haces de filamentos de actina en el núcleo de las microvellosidades de una célula epitelial intestinal. La célula se había fijado, se había tratado con fragmentos de miosina S1, se había congelado y se había grabado profundamente para exponer los componentes filamentosos del citoplasma. Los filamentos intermedios (IF) en el fondo de la micrografía no contienen actina y, por tanto, no se unen a los fragmentos de miosina S1. Estos filamentos intermedios se originan en los desmosomas de las superficies laterales de la célula.

FUENTE: De N. Hirokawa, L. G. Tilney, K. Fujiwara, y J. E. Heuser. *J Cell Biol* 1982;94:430, fig. 3; Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

Desde entonces, se ha identificado como una proteína principal en prácticamente todos los tipos de células eucariotas que se han examinado. Las especies superiores de plantas y animales poseen una serie de genes codificadores de actina cuyos productos codificados están especializados para diferentes tipos de procesos y estructuras. Las actinas se han conservado notablemente durante la evolución de eucariotas.

Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las moléculas de actina de una célula de levadura y del músculo esquelético de conejo son 88% idénticas. De hecho, las moléculas de actina de diversas fuentes pueden copolimerizarse para formar filamentos híbridos. Aunque los filamentos de actina pueden generar fuerzas por sí mismos (sección 9.15), la mayoría de los procesos que involucran la actina requieren la actividad de las proteínas motoras, específicamente las de la superfamilia de la miosina.

## Montaje y desmontaje de filamentos de actina

Antes de que se incorpore en un filamento, un monómero de actina se une a una molécula de ATP. La actina es una ATPasa, al igual que la tubulina es una GTPasa, y la función del ATP en el ensamblaje de actina es similar a la del GTP en el ensamblaje de microtúbulos (página 325). El ATP asociado con el monómero de actina se hidroliza a ADP en algún momento después de que se incorpora al final de un filamento de actina en crecimiento. Como consecuencia, la mayor parte de un filamento de actina consiste en subunidades de ADP-actina.

La polimerización de actina se demuestra fácilmente *in vitro* en soluciones que contienen monómeros de ATP-actina. Como en el caso de los microtúbulos, el evento de nucleación inicial en la formación de filamentos se produce lentamente *in vitro*, mientras que la etapa posterior de elongación del filamento se produce mucho más rápidamente. La etapa de nucleación lenta de la formación del filamento se puede evitar incluyendo los filamentos de actina preformados en la mezcla de reacción. Cuando los filamentos de actina preformados se incuban con una alta concentración de monómeros de ATP-actina marcados, ambos extremos del filamento se marcan, pero el extremo de púas de crecimiento rápido incorpora los monómeros a una velocidad aproximadamente 10 veces mayor que la del extremo puntiagudo (**FIGURA 9-39*a***).

La figura 9-39 ilustra cómo los eventos que ocurren durante el ensamblaje/desensamblaje de actina *in vitro* dependen de la concentración de monómeros de actina y de la dinámica de elongación de los extremos del filamento. Los extremos con púas y los extremos puntiagudos requieren diferentes concentraciones mí-

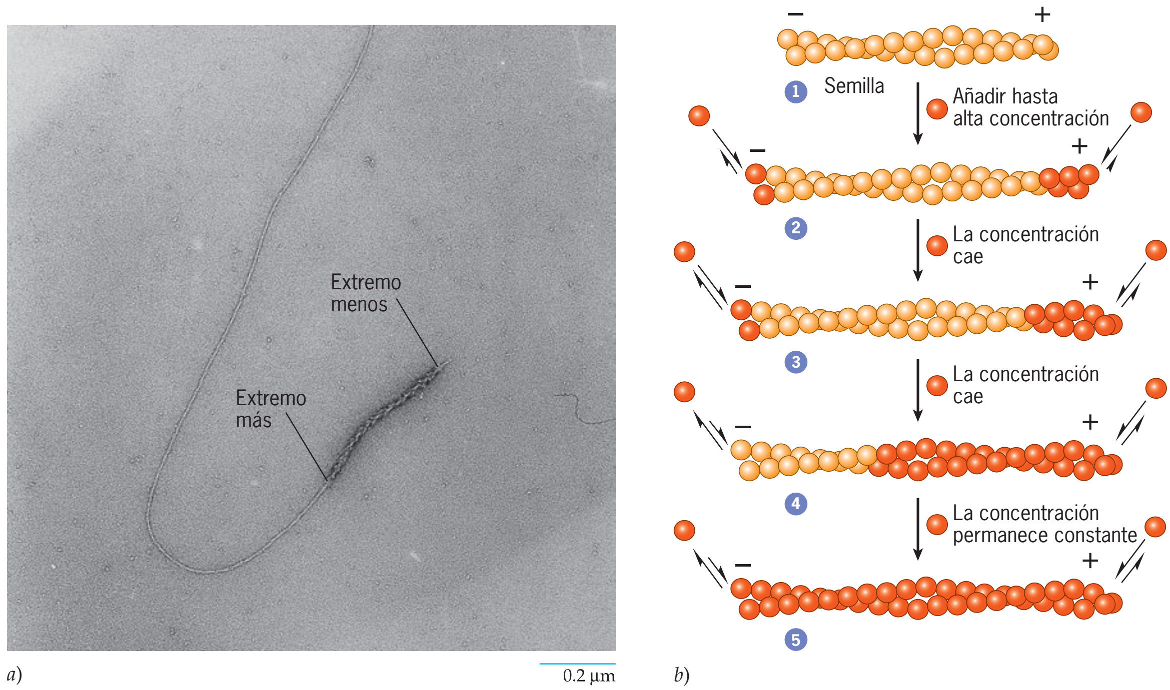



**FIGURA 9-39 Montaje de actina *in vitro*.** *a*) Micrografía electrónica de un filamento corto de actina que se marcó con S1 miosina y luego se utilizó para nuclear la polimerización de actina. La adición de subunidades de actina se produce mucho más rápidamente en el extremo con púas (más) que en el extremo puntiagudo (menos) del filamento existente. *b*) Diagrama esquemático de la cinética del ensamblaje de filamentos de actina *in vitro*. Todas las subunidades naranja son parte de la semilla original; las subunidades rojas estaban presentes en solución al comienzo de la incubación. Los pasos se describen en el texto. Una vez que se alcanza una concentración de monómeros en estado estable, las subunidades se agregan al extremo positivo a la misma velocidad en que se liberan desde el extremo menos. Como resultado, las subunidades se arrastran a través del filamento *in vitro*. *Nota:* No se intenta distinguir entre subunidades con un ATP vinculado frente a ADP.

FUENTE: Cortesía de MS Runge y TD Pollard.

nimas de monómeros de ATP-actina para alargarse, una medida conocida como la concentración crítica.

La concentración crítica del extremo con púas es mucho menor que el extremo puntiagudo, lo que significa que el extremo con púas puede continuar alargándose a concentraciones de ATP-actina más bajas que el extremo puntiagudo. Supongamos que comencemos añadiendo filamentos de actina preformados (semillas) a una solución de actina en presencia de ATP (paso 1). Siempre que la concentración de monómeros de ATP-actina permanezca alta, las subunidades se seguirán añadiendo en ambos extremos del filamento (paso 2, figura 9-39*b*). Como los monómeros en la mezcla de reacción se consumen por adición a los extremos de los filamentos, la concentración de ATP libre-actina sigue bajando hasta que se alcanza un punto en la adición neta de monómeros que continúa al final de las púas. Esta tiene una menor concentración crítica de ATP-actina, pero se detiene en el extremo puntiagudo, que tiene una mayor concentración crítica para ATP-actina (paso 3). A medida que continúa la elongación del filamento, la concentración de monómero libre cae más. En este punto, los monómeros continúan agregándose a los extremos con púas de los filamentos, pero ocurre una pérdida neta de subunidades en su extremo puntiagudo. A medida que disminuye la concentración de monómero libre, se alcanza un punto donde las dos reacciones en los extremos opuestos de los filamentos están equilibradas de modo que ambas longitudes de los filamentos y la concentración de monómeros libres permanece constante (paso 4). Este tipo de equilibrio entre dos actividades opuestas es un ejemplo de estado estacionario (sección 3.4) y se produce cuando la concentración de ATP-actina es de aproximadamente 0.3 µM. Debido a que las subunidades se están agregando a los extremos con púas y se eliminan de la punta al final de cada filamento en estado estacionario, la posición relativa de las subunidades individuales dentro de cada filamento se mueve continuamente, un proceso conocido como "efecto noria o movimiento rodante" (pasos 4-5). Los estudios sobre células vivas que contienen subunidades de actina marcadas fluorescentemente han demostrado la aparición de este efecto *in vivo* (véase figura 9-46c).

Como se discutió en la sección 9.13, la velocidad de ensamblaje y desmontaje de los filamentos de actina en la célula puede verse influida por varias proteínas accesorias diferentes. Los cambios en las condiciones locales en una parte particular de la célula pueden impulsar eventos allí hacia el ensamblaje o el desensamblaje de los microfilamentos. Al controlar este comportamiento dinámico, la célula puede reorganizar su citoesqueleto de actina. Tal reorganización es necesaria para procesos dinámicos como locomoción celular, cambios en la forma de la célula, fagocitosis y citoquinesis.

Como se señaló anteriormente, los filamentos de actina desempeñan un papel en casi todos los procesos móviles de una célula. La implicación de estos filamentos se demuestra con más facilidad por el tratamiento de las células con uno de los siguientes fármacos que interrumpen actividades dinámicas basadas en actina: citocalasina, derivado de un molde, que bloquea los extremos de púas de los filamentos de actina y permite la despolimerización en el extremo en punta; faloidina, obtenida de un hongo venenoso, que se une a los filamentos de actina intactos y evita su renovación; y latrunculina, obtenida de una esponja, que se une a monómeros libres y bloquea su incorporación al polímero. Los procesos mediados por actina se detienen rápidamente cuando las células contienen uno de estos compuestos.

## REPASO

1. Compare y contraste las características del conjunto de microtúbulos con el conjunto de filamentos de actina.
2. Compare la estructura de un microtúbulo completamente ensamblado, el filamento de actina y el filamento intermedio.
3. Describa tres funciones de los filamentos de actina.

## 9.11 La miosina: el motor molecular de la actina

Hemos examinado previamente la estructura y las acciones de dos motores moleculares: cinesina y dineína, que operan en direcciones opuestas sobre las pistas de los microtúbulos. Hasta la fecha, todos los motores que se sabe que funcionan junto con los filamentos de actina son miembros de la superfamilia de las miosinas. Estas, con la principal excepción de la miosina VI, que se analiza a continuación, se mueven hacia el extremo con púas de un filamento de actina.

La miosina se aisló por primera vez a partir de tejido de músculo esquelético de mamífero y, posteriormente, se ha encontrado en casi todas las células eucariotas. Todas las miosinas comparten un dominio motor (cabeza) característico. La cabeza contiene un sitio que se une a un filamento de actina y un sitio que se une e hidroliza el ATP para impulsar el motor de la miosina. Mientras que los dominios principales de varias miosinas son similares, los dominios de la cola son altamente divergentes. Las miosinas también contienen una variedad de cadenas de bajo peso molecular (ligeras). Generalmente se dividen en dos grandes grupos: las **miosinas convencionales** (o **tipo II**), que se identificaron por primera vez en el tejido muscular, y las **miosinas no convencionales**. Estas se subdividen sobre la base de la secuencia de aminoácidos en al menos 17 clases diferentes (tipo I y tipos III-XVIII). Algunas de estas clases se expresan ampliamente entre eucariotas, mientras que otras están restringidas. La miosina X, por ejemplo, se encuentra solo en los vertebrados, y las miosinas VIII y XI están presentes solo en las plantas. Los humanos contienen alrededor de 40 miosinas diferentes de al menos 12 clases, cada una de las cuales se presume que tiene su propia función especializada. De las diversas miosinas, las de la clase convencional (tipo II) se comprenden mejor.

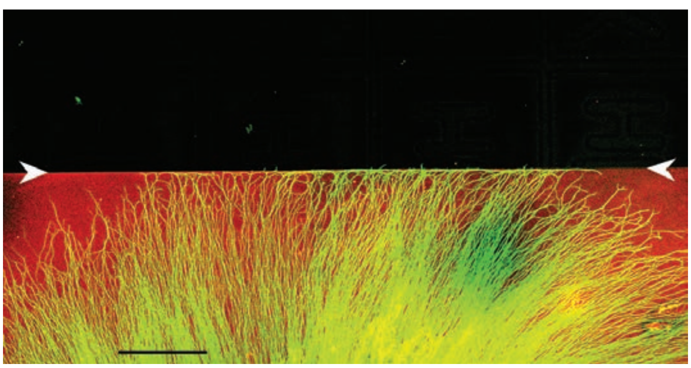
### Miosinas convencionales (tipo II)

Las proteínas de la clase de la miosina II son los principales motores para la contracción muscular, pero también se encuentran en una variedad de células no musculares. El genoma humano codifica 16 cadenas pesadas de miosina II diferentes, tres de las cuales funcionan en células no musculares. Todas las miosinas II se mueven hacia el extremo con púas de un filamento de actina. Entre sus actividades no musculares, se requieren miosinas tipo II para dividir una célula en dos durante la división celular, generando tensión en las adherencias focales, la migración celular y el comportamiento de giro de los conos de crecimiento (véase figura 9-67). El efecto de inhibir la actividad de miosina II en un cono de crecimiento en avance se muestra en la **FIGURA 9-40**.

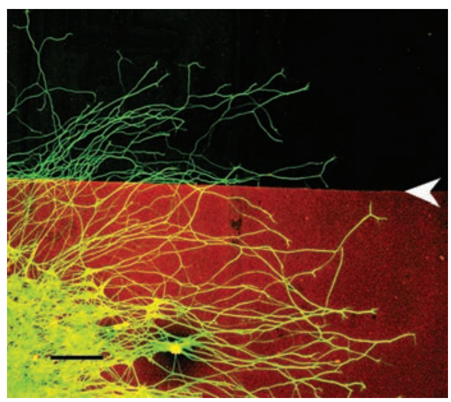
En la **FIGURA 9-41*a*)** se muestra una micrografía electrónica de un par de moléculas de miosina II. Cada molécula de miosina II está compuesta por seis cadenas polipeptídicas, un par de cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras, organizadas de tal forma que producen una proteína altamente asimétrica (figura 9-41*a*). El examen de la molécula en la figura 9-41*b* muestra que consiste en 1) un par de cabezas globulares que contienen el sitio catalítico de la molécula; 2) un par de cuellos, cada uno formado por una única alfahélice ininterrumpida y dos cadenas ligeras asociadas; y 3) una única cola larga en forma de vara formada por el entrelazado de largas secciones alfahelicoidales de las dos cadenas pesadas. Las cabezas de miosina aisladas (fragmentos S1 de la figura 9-41*b*) que se han inmovilizado sobre la superficie de un cubreobjetos de vidrio son capaces de deslizar filamentos de actina unidos en un ensayo *in vitro* tal como el mostrado en la **FIGURA 9-42**. Por tanto, toda la maquinaria requerida para la actividad motriz está contenida en una sola cabeza. El mecanismo de acción de la cabeza de miosina y el papel clave desempeñado por el cuello se analizan en la figura 9-52. La porción de cola fibrosa de una molécula de miosina II desempeña un papel estructural, lo que permite que la proteína forme filamentos. Las moléculas de miosina II se ensamblan de modo que los extremos de las colas apuntan hacia el centro del filamento y las cabezas globulares apuntan en dirección opuesta al centro (**FIGURAS 9-43** y 9-49). Como resultado, el filamento se describe como bipolar, lo que indica una inversión de la polaridad en el centro del filamento. Debido a que son bipolares, las cabezas de miosina en los extremos opuestos de un filamento de miosina tienen la capacidad de tirar de los filamentos de actina uno hacia el otro, como ocurre en una célula muscular. Como se describe en la siguiente sección, algunos filamentos de miosina II se ensamblan en construcción transitoria, cuando y donde se necesitan y luego se desmontan después de que han actuado.

### Miosinas no convencionales

En 1973 Thomas Pollard y Edward Korn de los Institutos Nacionales de la Salud describieron una proteína única similar a la



*a*)



*b*)

**FIGURA 9-40 Demostración experimental de un papel para la miosina II en el movimiento direccional de los conos de crecimiento.** *a*) Microfotografía de fluorescencia que muestra procesos finos (neuritas) que crecen a partir de un fragmento microscópico de tejido nervioso embrionario de ratón. Las neuritas (teñidas de verde) crecen hacia afuera en un cubreobjetos de vidrio recubierto con tiras de laminina (teñidas de rojo). La laminina es un componente común de la matriz extracelular (página 229). La punta de cada proceso nervioso contiene un cono de crecimiento móvil. Cuando los conos de crecimiento alcanzan el borde de la tira de laminina (indicado por la línea con puntas de flecha), giran bruscamente y continúan creciendo sobre la superficie recubierta de laminina. Bar, 500 µm. *b*) El tejido en esta micrografía se obtuvo de un embrión de ratón que carece de miosina IIB. Los conos de crecimiento ya no giran cuando alcanzan el borde de la superficie revestida de laminina, haciendo que las neuritas crezcan hacia una superficie (negra) que carece de laminina. Bar, 80 µm.

FUENTE: a) De Stephen G. Turney y Paul C. Bridgman. *Nature Neurosci* 2005;8:717; © 2005, reimpreso con autorización de Macmillan Publishers, Ltd; *b*) De Stephen G. Turney y Paul C. Bridgman. *Nature Neurosci* 2005;8:717; © 2005, reproducida con permiso de Macmillan Publishers, Ltd.

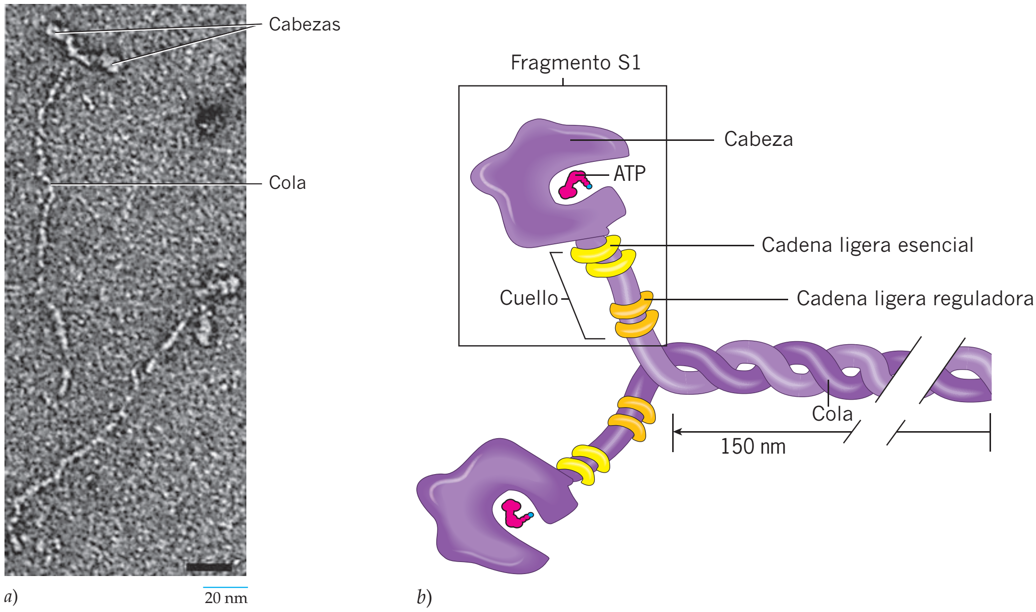



**FIGURA 9-41 Estructura de una molécula de miosina II.** *a*) Micrografía electrónica de moléculas de miosina teñidas negativamente. Las dos cabezas y la cola de cada molécula son claramente visibles. *b*) Un dibujo muy esquemático de una molécula de miosina II (masa molecular de 520 000 daltones). La molécula consiste en un par de cadenas pesadas (púrpura) y dos pares de cadenas ligeras, que se nombran como se indica. Las cadenas pesadas emparejadas consisten en una cola en forma de varilla en la que porciones de las dos cadenas polipeptídicas se envuelven una alrededor de la otra para formar una bobina enrollada y un par de cabezas globulares. Cuando se trata con una proteasa en condiciones suaves, la molécula se escinde en la unión entre el cuello y la cola, que genera el fragmento S1.

FUENTE: *a*) de SA Burgess, M. L. Walker, H. D. White y J. Trinick. *J Cell Biol* 1997;139:676, fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

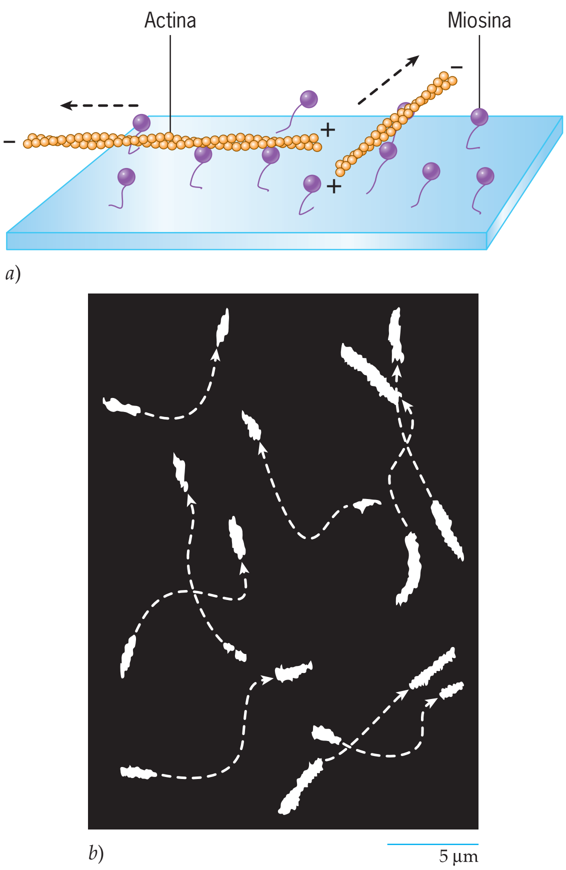



**FIGURA 9-42 Ensayo de motilidad *in vitro* para la miosina.** *a*) Dibujo esquemático en el que las cabezas de miosina se unen a un cubreobjetos revestido de silicona, que luego se incuba con una preparación de filamentos de actina. *b*) Resultados del experimento representado en *a*. Se tomaron dos imágenes con una separación de 1.5 segundos y se fotografiaron como una exposición doble en el mismo fotograma de la película. Las líneas punteadas con puntas de flecha muestran el movimiento deslizante de los filamentos de actina sobre las cabezas de miosina durante el breve período entre las exposiciones.

FUENTE: *b*) Basado en el trabajo de T. Yanagida.

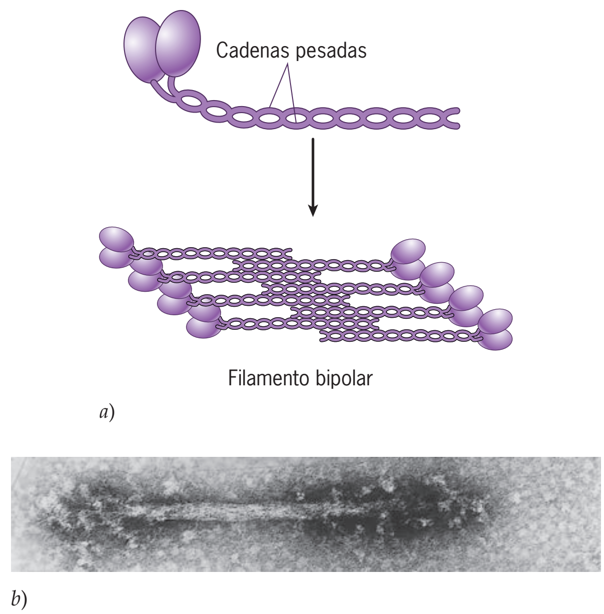



**FIGURA 9-43 Estructura de un filamento de miosina II bipolar.** *a*) Diagrama esquemático de la disposición escalonada de las moléculas de miosina individuales en un filamento de miosina II. *b*) Microfotografía electrónica de un filamento de miosina bipolar formado *in vitro*. Las cabezas del filamento se ven en ambos extremos, dejando una sección lisa en el centro del filamento.

FUENTE: *b*) Cortesía de Hugh Huxley.

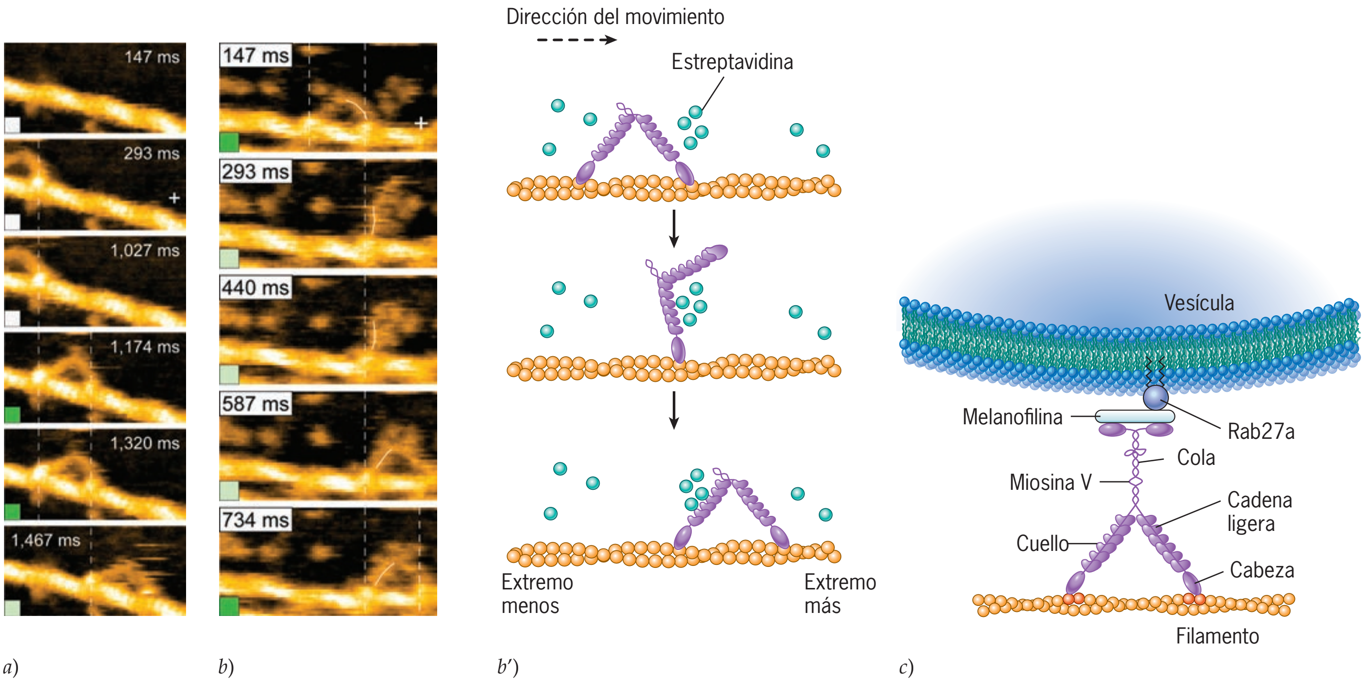



**FIGURA 9-44 Miosina V: una miosina no convencional de dos cabezas involucrada en el transporte de organelos.** *a*) Visualización directa de una sola molécula de miosina V (una que carece de su dominio de cola normal) a medida que se mueve a lo largo de un filamento de actina *in vitro* en presencia de ATP. Usando una microscopía de fuerza atómica de alta velocidad (HS-AFM, *high-speed atomic force microscopy*), esta serie de imágenes muestra el movimiento de la molécula durante un período de aproximadamente un segundo. *b*) Imágenes satisfactorias de HS-AFM que muestran el movimiento de mano sobre mano de una sola molécula de miosina V a medida que pasa a través de un grupo de obstáculos (que consisten en moléculas de proteína de estreptavidina). El cuello oscilante (o brazo de palanca) se resalta con una línea blanca fina. Los dibujos interpretativos (b) representan la proteína motora como se ve en varias de las imágenes correspondientes de HS-AFM. Una película continua del movimiento de la proteína se puede ver en el suplemento de este artículo. c) Dibujo esquemático de una molécula de miosina V dimérica completa, que incluye sus numerosas cadenas ligeras, con ambas cabezas unidas a un filamento de actina y su dominio de cola unido a una vesícula. La Rab27a y la melanofilina sirven como adaptadores que unen los extremos globulares de la cola a la membrana de la vesícula. El cuello largo de la miosina V se une a 6 cadenas ligeras.

FUENTE: Tomada de Noriyuki Kodera, *et al*. *Nature* 2010;468:74, © 2010, reimpreso con permiso de Macmillan Publsihers, Ltd. Cortesía de Toshio Ando.

miosina que se extrajo del protista *Acanthamoeba*. A diferencia de la miosina muscular, esta miosina no convencional más pequeña tenía una sola cabeza y no podía ensamblarse en filamentos *in vitro*; la proteína se conoce como miosina I. Como se refleja en el dibujo de un microvillus en la figura 9-58, la miosina I a menudo sirve como un enlace cruzado entre los filamentos de actina del citoesqueleto y la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Se ha sugerido que la miosina I puede ejercer tensión sobre la membrana plasmática, lo que podría desempeñar un papel en procesos que requieren movimiento o deformación de la membrana.

Ninguna de las miosinas no convencionales es capaz de formar filamentos y en su lugar parece funcionar principalmente como moléculas de proteínas individuales. Las miosinas no convencionales mejor estudiadas son capaces de moverse de forma mecánica a lo largo de los filamentos de actina, de forma análoga a como las cinesinas y la dineína citoplásmica se mueven a lo largo de los microtúbulos. Los pasos tomados por una de estas miosinas, la miosina V, se han revelado en una notable serie de micrografías de fuerza atómica que capturan una sola molécula a medida que se mueve rápidamente a lo largo de un filamento de actina *in vitro* (**FIGURA 9-44*a***). Con el fin de visualizar los diversos pasos en el ciclo mecánico de la proteína, estos investigadores colocaron obstáculos moleculares en el camino de la proteína motora en movimiento, lo que ralentizó la velocidad a la que la proteína pudo viajar. La figura 9-44*b*) muestra una serie de imágenes que revelan los movimientos de la molécula durante un solo ciclo mecánico. [Tenga en cuenta que la miosina V normalmente tiene un segmento de cola considerable, como se muestra en la figura 9-44*c*), que se ha eliminado para estos experimentos en particular.]

En el primer cuadro de la figura 9-44*b*), se ve que ambas cabezas de la proteína dímera están unidas al filamento subyacente, y se observa un grupo de obstáculos en la trayectoria del motor. En el segundo cuadro, el cabezal posterior de la molécula de miosina V se ha desprendido del filamento y está en proceso de avanzar a través de las barricadas en su camino. En el cuarto marco, esta cabeza oscilante ha hecho contacto con el filamento en una posición adelantada a lo largo del filamento y, por tanto, se ha convertido en la nueva cabeza líder. Estas imágenes proporcionan una confirmación visual de que la miosina V se mueve de forma mano a mano, similar a la de la molécula de cinesina en el dibujo de la figura 9-9*b*. Para lograr este tipo de movimiento, al menos una de las dos cabezas debe estar unida a su pista polarizada en todo momento. La figura 9-44*c*) muestra una ilustración de una molécula de miosina V intacta.

Como se ve en esta ilustración, la miosina V es notable por la longitud de cada cuello, que a 23 nm es aproximadamente tres veces mayor que la miosina II.

Debido a sus largos cuellos, que actúan como un brazo oscilante (o palanca) durante el movimiento, la miosina V puede dar pasos muy grandes. Esto es muy importante para una proteína motora que se mueve de forma progresiva a lo largo de un filamento de actina compuesto de hebras helicoidales de subunidades. La hélice de actina se repite sobre cada 13 subunidades (36 nm), que es casi el tamaño del paso de una molécula de miosina V (figura 9-44*b*). Para lograr este tipo de movimiento, cada cabeza de miosina debe moverse una distancia de 72 nm, el doble de la distancia entre dos sitios de unión sucesivos en el filamento de actina (figura 9-44*b*). Como resultado de sus pasos gigantes, la miosina V puede caminar a lo largo del filamento en una trayectoria recta, aunque la “carretera” subyacente gira 360 ∞ entre sus “pies”. Varias miosinas no convencionales (incluidas la miosina I, V y VI) están asociadas con varios tipos de vesículas y organelos citoplásmicos. En algunos casos, estas miosinas pueden actuar principalmente como ataduras de organelos y en otros casos co-

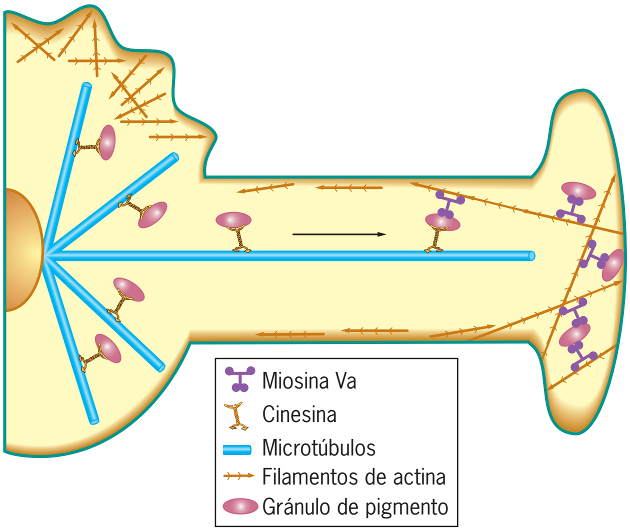



**FIGURA 9-45 Los roles contrastantes de los motores basados en microtúbulos y microfilamentos en el transporte intracelular.** Se cree que la mayoría del transporte de vesículas está mediado por miembros de las familias cinesinas y dineínas, que transportan su carga a distancias relativamente largas. Se cree que algunas vesículas también transportan motores de miosina, como la miosina Va, que transportan su carga sobre microfilamentos, incluidos los presentes en las regiones periféricas (corticales) de la célula. Los dos tipos de motores pueden actuar de una manera cooperativa, como se ilustra aquí en el caso de una célula de pigmento de rana en la que los gránulos de pigmento se mueven hacia delante y hacia atrás dentro de procesos celulares extendidos.

FUENTE: Por X, Wu, *et al*. Copyright 1998, Rockefeller University Press. Originalmente publicado en *Journal of Cell Biology* 1915;143.

mo sus transportadores. Se ha demostrado que algunas vesículas contienen motores basados en microtúbulos (cinesinas y/o dineína citoplásmica) y motores basados en microfilamentos (miosinas no convencionales), y, de hecho, los dos tipos de motores pueden estar físicamente vinculados entre sí. El movimiento de vesículas y otros portadores membranosos a lo largo de largas distancias dentro de las células animales se produce en los microtúbulos, como se describió previamente. Sin embargo, una vez que se acercan al final de los microtúbulos, a menudo se piensa que estas vesículas membranosas cambian a las pistas de microfilamentos para el movimiento local a través de la periferia rica en actina de la célula, que está mediada por miosinas (**FIGURA 9-45**).

La cooperación entre microtúbulos y microfilamentos se ha estudiado mejor en células pigmentarias (figura 9-45). En los mamíferos, los gránulos de pigmento (melanosomas) son transportados en los procesos periféricos finos de la célula de pigmento por una de las isoformas de la miosina V llamados Va. Los melanosomas se transfieren a los folículos capilares donde se incorporan a un cabello en desarrollo. Los ratones que carecen de actividad de miosina Va no pueden transferir melanosomas a los folículos capilares, lo que hace que su pelaje tenga un color mucho más claro. Los seres humanos que carecen de un gen normal que codifica la miosina Va padecen un raro trastorno llamado síndrome de Griscelli; estas personas exhiben albinismo parcial (falta de coloración de la piel) y sufren otros síntomas que se cree que están relacionados con defectos en el transporte de vesículas. En 2000 se descubrió que un subconjunto de pacientes con Griscelli tenía un gen Va de miosina normal, pero carecía de un gen funcional que codifica una proteína de membrana periférica llamada Rab27a. La familia de proteínas Rab se discutió en la página 288 como moléculas que regulan el tráfico de vesículas. Las rabs también están involucradas en la unión de los motores de miosina (y cinesina) a las superficies de la membrana (figura 9-44*c*).

Las células ciliadas del oído interno, cuya estructura se muestra en la **FIGURA 9-46*a***, han sido un sistema particularmente bueno para estudiar las funciones de las miosinas no convencionales. Las células ciliadas se nombran por el conjunto de estereocilios rígidos, semejantes a pelos, que se proyectan desde la superficie apical de la célula hacia la cavidad llena de líquido del oído interno. El desplazamiento de los estereocilios por estímulos mecánicos conduce a la apertura de los canales de $Ca^{2+}$ en la membrana plasmática y la posterior generación de impulsos nerviosos que percibimos como sonido. Los estereocilios no tienen relación con los verdaderos cilios discutidos anteriormente. En lugar de contener microtúbulos, cada estereocilio está soportado por un haz de filamentos de actina paralelos (figura 9-46*b*) cuyos extremos con púas están ubicados en la punta exterior de la proyección y los extremos puntiagudos en la base. Los estereocilios han proporcionado algunas de las imágenes más sorprendentes de la naturaleza dinámica del citoesqueleto de actina. Mientras que los estereocilios en sí mismos son estructuras permanentes, los haces de actina están en constante cambio. Los monómeros de actina se unen continuamente al extremo con púas de cada filamento, la cinta de correr a través del cuerpo del filamento, y se disocian del extremo puntiagudo. Este proceso se captura en la micrografía de fluorescencia de la figura 9-46*c*, que muestra la incorporación de subunidades de actina marcadas con GFP en el extremo con púas de cada filamento. Varias miosinas no convencionales (I, III, V, VI, VII y XV) se localizan en diferentes sitios dentro de las células ciliadas del oído interno; dos de estos se muestran en la figura 9-46*d* y *e*. Las mutaciones en la miosina VIIa son la causa del síndrome de Usher 1B, que se caracteriza por sordera y ceguera. Los efectos morfológicos de las mutaciones en el gen de la miosina VIIa en las células ciliadas del oído interno de los ratones se muestran en la figura 9-46*f*, *g*. Al igual que en los humanos, los ratones que son homocigotos para el alelo mutante que codifica esta proteína motora son sordos.

La miosina VI, un transportador orgánico de organelos en el citoplasma de muchas células, se distingue por su movimiento en "dirección inversa", es decir, hacia el extremo puntiagudo de un filamento de actina. La miosina VI se encuentra en la base de la estereocilia, donde podría conectar el citoesqueleto a la membrana plasmática que lo recubre. En otros tipos de células, se cree que la miosina VI está involucrada en la formación de vesículas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática, el movimiento de las vesículas sin recubrimiento a los endosomas tempranos y el mantenimiento de la morfología de Golgi. Las mutaciones en la miosina VI son la causa de varias enfermedades hereditarias.

Ahora que hemos descrito los principios básicos de la estructura y función de la actina y la miosina, podemos ver cómo estas dos proteínas interactúan para mediar en una actividad celular compleja.

**REPASO**

1. Contraste la estructura y función de la miosina II convencional y la miosina no convencional V.
2. ¿Cómo es posible transportar la misma vesícula a lo largo de ambos microtúbulos y microfilamentos?

## 9.12 Organización muscular y contracción

Los músculos esqueléticos derivan su nombre del hecho de que la mayoría de ellos están anclados a los huesos que se mueven.

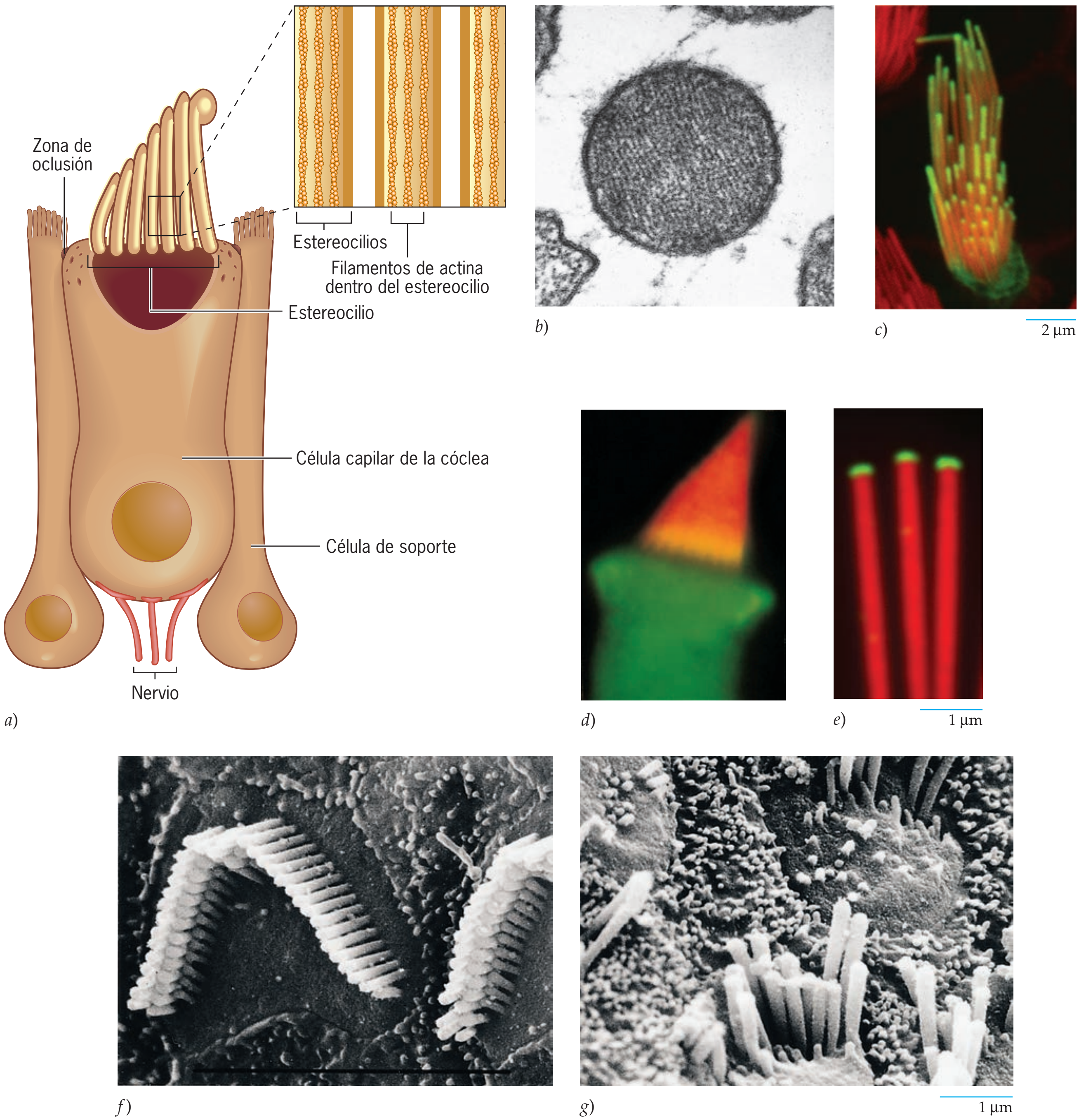



**FIGURA 9-46 Células capilares, haces de actina y miosinas no convencionales.** *a*) Dibujo de una célula capilar de la cóclea. El recuadro muestra una porción de varios de los estereocilios, que están compuestos por un haz de filamentos de actina estrechamente agrupados. *b*) Microfotografía electrónica de transmisión de una sección transversal de un estereocilio que muestra que se compone de un haz denso de filamentos de actina. *c*) Microfotografía de fluorescencia de una célula capilar del vestíbulo de un oído interno de una rata. Las puntas de los estereocilios se etiquetan de color verde debido a la incorporación de monómeros de GFP-actina en sus extremos con púas. Los estereocilios contienen una columna más larga de subunidades marcadas con GFP, que refleja una incorporación más rápida de los monómeros de actina. Los estereocilios aparecen rojos debido al marcado de la faloidina marcada con rodamina, que se une a los filamentos de actina. *d*) Una célula capilar del oído interno de la rana toro. La localización de la miosina VIIa está indicada en verde. Las bandas anaranjadas cerca de las bases de los estereocilios (debido al solapamiento rojo y verde) indican una concentración de miosina VIIa. *e*) La miosina XVa (verde) se localiza en las puntas de los estereocilios de una célula capilar auditiva de rata. *f*) Micrografía electrónica de barrido de las células ciliadas de la cóclea de un ratón de control. Los estereocilios están dispuestos en filas en forma de V. *g*) Una micrografía correspondiente de las células ciliadas de un ratón con mutaciones en el gen que codifica la miosina VI. Los estereocilios de las células ciliadas exhiben una disposición desorganizada. Tanto la miosina VI como la miosina VIIa son necesarias para el desarrollo y el mantenimiento adecuados de las células pilosas.

FUENTE: *a*) T. Hasson. *Curr Biology* 1999;9:22; con permiso de Elsevier Science; *b*) Cortesía de A. J. Hudspeth, R. A. Jacobs y P. G. Gillespie; *c*) de AK Rzadzinska, *et al*. *J Cell Biol* 2004;(164):891-892, figura 4, reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de B Kachar; *d*) De Peter Gillespie y T. Hasson, *et al*. *J Cell Biol* 1997;(137), portada #6. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; e) De AK Rzadzinska, *et al*. *J Cell Biol* 2004;(164):891-892, figura 5, reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de B Kachar; *f*) De Tim Self, *et al*. Cortesía de Karen P Steel. *Develop* 1998;125:560; Reproducida con permiso de The Company of Biologists, Ltd. http://dev.biologists.org/content/125/4/557.full.pdf+html?sid=1524ec24-e6c0-413f-9c05-ac2111083a85.

Están bajo control voluntario y se les puede ordenar conscientemente que se contraigan. Las células del músculo esquelético tienen una estructura muy poco ortodoxa. Una única célula muscular de forma cilíndrica tiene típicamente un grosor de 10 a 100 µm, más de 100 mm de largo y contiene cientos de núcleos. Debido a estas propiedades, una célula del músculo esquelético se llama más apropiadamente fibra muscular. Las fibras musculares tienen múltiples núcleos porque cada fibra es un producto de la fusión de un gran número de mioblastos mononucleados (células premúsculas) en el embrión.

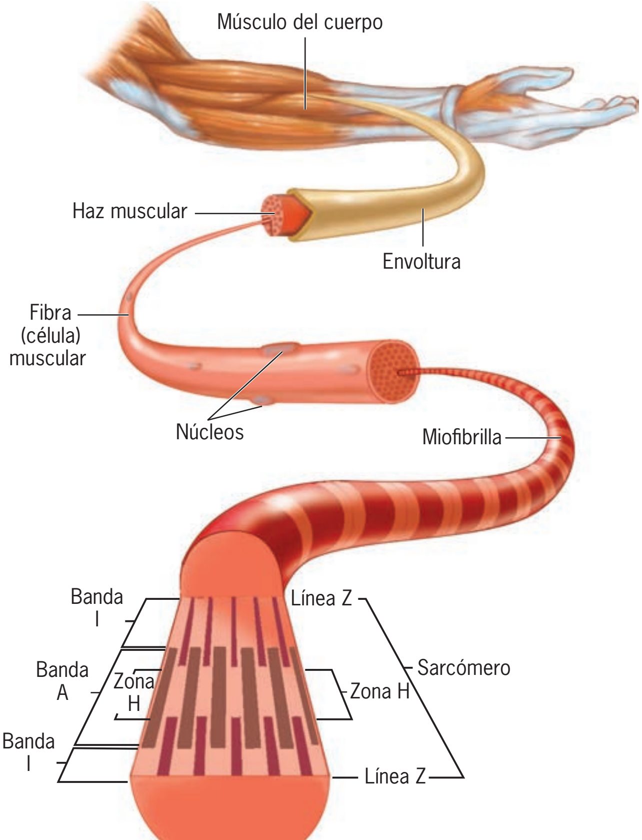
## Organización de los sarcómeros

Las células musculares esqueléticas pueden tener la estructura interna más altamente ordenada de cualquier célula en el cuerpo. Una sección longitudinal de una **fibra muscular** (**FIGURA 9-47**) revela un cable formado por cientos de hebras cilíndricas más delgadas, llamadas miofibrillas. Cada **miofibrilla** consiste en una matriz lineal repetitiva de unidades contráctiles, llamadas **sarcómeros**. Cada sarcómero a su vez exhibe un patrón de bandas característico, que le da a la fibra muscular una apariencia rayada o estriada. El examen de las fibras musculares teñidas en el microscopio electrónico muestra que el patrón de bandas es el resultado de la superposición parcial de dos tipos distintos de filamentos, **filamentos finos** y **filamentos gruesos** (**FIGURA 9-48*a***). Cada sarcómero se extiende desde una línea Z a la siguiente línea Z y contiene varias bandas oscuras y zonas claras. Un sarcómero tiene un par de bandas I ligeramente coloreadas ubicadas en sus bordes externos, una banda A que se tiñe más densamente ubicada entre las bandas externas I, y una zona H un tanto coloreada, ubicada en el centro de la banda A. Una línea M densamente teñida se encuentra en el centro de la zona H. La banda I contiene solo filamentos delgados, la zona H solo filamentos gruesos, y esa parte de la banda A en cada lado de la zona H representa la región de superposición y contiene ambos tipos de filamentos.

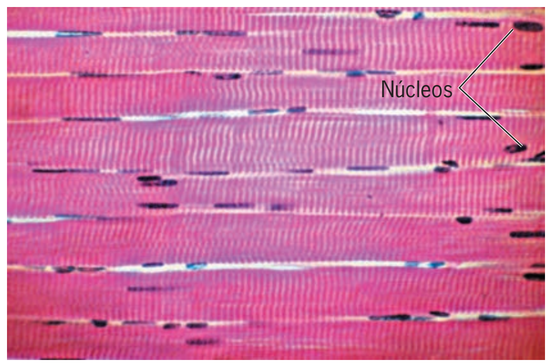
Las secciones transversales a través de la región de superposición muestran que los filamentos delgados están organizados en una disposición hexagonal alrededor de cada filamento grueso y que cada filamento delgado está situado entre dos filamentos gruesos (figura 9-48*b*). Las secciones longitudinales muestran la presencia de proyecciones de los filamentos gruesos a intervalos regularmente espaciados. Las proyecciones representan puentes cruzados capaces de formar uniones con otros delgados filamentos vecinos.

## El modelo de filamento deslizante de la contracción muscular

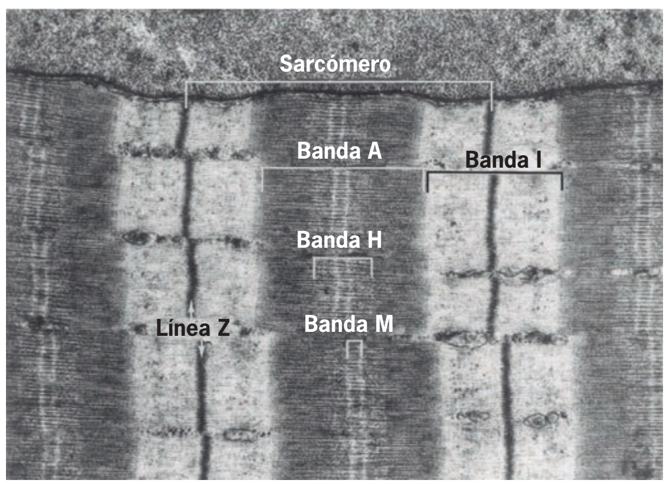
Todos los músculos esqueléticos operan acortando; no hay otra forma en que puedan realizar un trabajo. Las unidades de acortamiento son los sarcómeros, cuya disminución combinada en la longitud explica la disminución en la longitud de todo el músculo. La clave más importante para el mecanismo que subyace a la contracción muscular vino de las observaciones del patrón de bandas de los sarcómeros en diferentes etapas del proceso contráctil. A medida que se acortaba la fibra muscular, la banda A en cada sarcómero permanecía esencialmente constante en longitud, mientras que las bandas H e I disminuían en anchura y luego desaparecían por completo. A medida que avanzaba el acortamiento, las líneas Z en ambos extremos del sarcómero se movían hacia adentro hasta que contactaban con los bordes exteriores de la banda A (**FIGURA 9-49**).




*a*)




*b*)




*c*)

**FIGURA 9-47 La estructura del músculo esquelético.** *a*) Niveles de organización de un músculo esquelético. *b*) Micrografía de luz de una fibra muscular multinucleada. *c*) Microfotografía electrónica de un sarcómero con las bandas rotuladas.

FUENTE: *b*) Eric Grave/Photo Researchers, Inc.; *c*) Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.

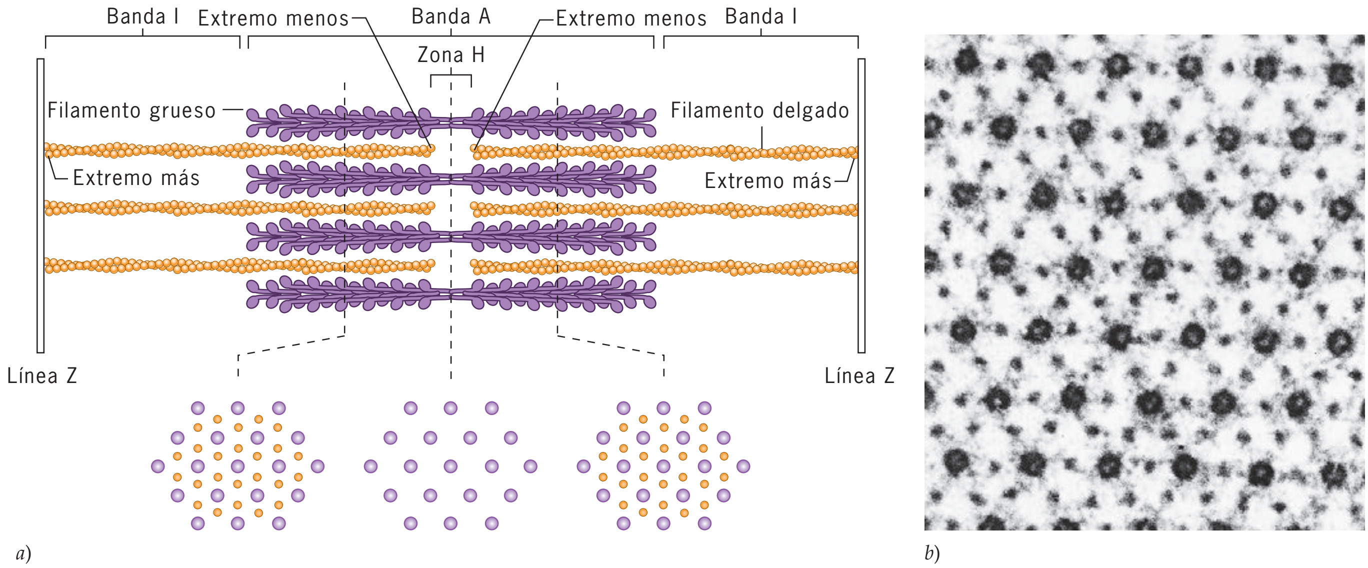



**FIGURA 9-48 La maquinaria contráctil de un sarcómero.** *a*) Diagrama de un sarcómero que muestra el conjunto superpuesto de filamentos finos que contienen actina (naranja) y gruesos que contienen miosina (púrpura). Las pequeñas proyecciones transversales en la fibra de miosina representan las cabezas de miosina (puentes cruzados). *b*) Micrografía electrónica de una sección transversal a través de un músculo de vuelo de insecto que muestra la disposición hexagonal de los filamentos delgados alrededor de cada filamento grueso.

FUENTE: *b*) J Auber/Photo Researchers, Inc.

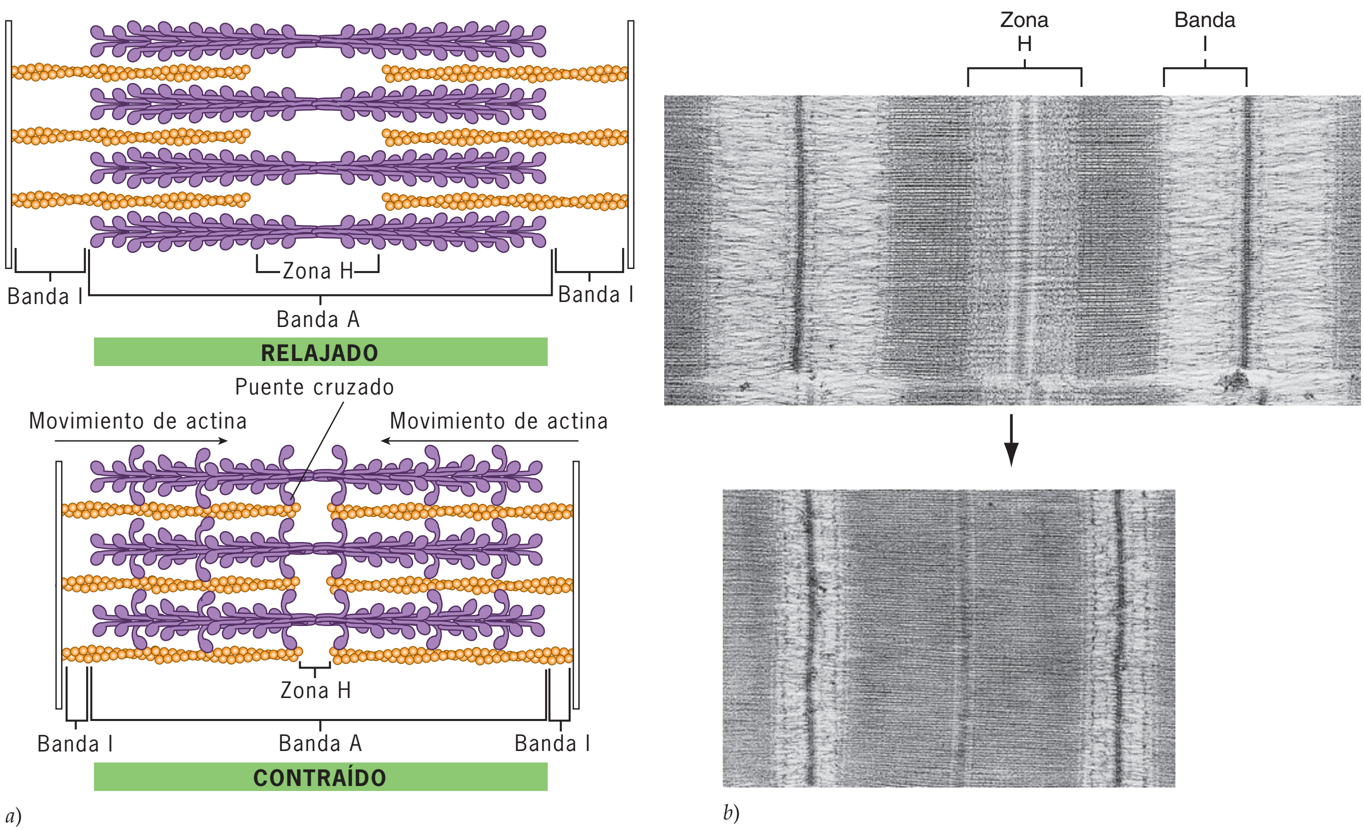



**FIGURA 9-49 El acortamiento del sarcómero durante la contracción muscular.** *a*) Diagrama esquemático que muestra la diferencia en la estructura del sarcómero en un músculo relajado y contraído. Durante la contracción, los puentes cruzados de miosina entran en contacto con los filamentos finos circundantes, y los filamentos delgados se ven obligados a deslizarse hacia el centro del sarcómero. Los puentes cruzados funcionan de forma asíncrona, de modo que solo una fracción está activa en un instante dado. *b*) Micrografías electrónicas de secciones longitudinales a través de un sarcómero relajado (arriba) y contraído (abajo). Las micrografías muestran la desaparición de la zona H como resultado del deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero.

FUENTE: *b*) James E. Dennis/Phototake.

Sobre la base de estas observaciones, dos grupos de investigadores británicos, Andrew Huxley y Rolf Niedergerke, y Hugh Huxley y Jean Hanson, propusieron un modelo de gran alcance en 1954 para explicar la contracción muscular. Propusieron que el acortamiento de los sarcómeros individuales no se debía al acortamiento de los filamentos, sino a que se deslizaran unos sobre otros. El deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero daría como resultado el aumento observado en la superposición entre los filamentos y el ancho reducido de las bandas I y H (figura 9-49). El modelo de filamento deslizante fue rápidamente aceptado, y la evidencia a su favor continúa acumulándose.

**LA COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS GRUESOS Y DELGADOS.** Además de la actina, los filamentos delgados de un músculo esquelético contienen otras dos proteínas, la tropomiosina y la troponina (**FIGURA 9-50**). La tropomiosina es una molécula alargada (de aproximadamente 40 nm de longitud) que se ajusta de forma segura en los surcos dentro del filamento delgado. Cada molécula de tropomiosina en forma de bastón se asocia con siete subunidades de actina a lo largo del filamento delgado (figura 9-50). La troponina es un complejo proteico globular compuesto por tres subunidades, cada una de las cuales tiene un papel importante y distinto en la función general de la molécula. Las moléculas de troponina están espaciadas aproximadamente a 40 nm a lo largo del filamento delgado y entran en contacto con los componentes de actina y tropomiosina del filamento. Los filamentos de actina de cada mitad de sarcómero están alineados con sus extremos de púas unidos a la línea Z.

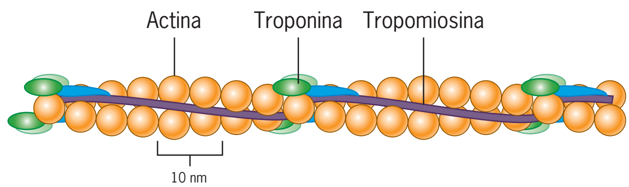



**FIGURA 9-50 La organización molecular de los filamentos delgados.** Cada uno de ellos consiste en una matriz helicoidal de subunidades de actina con moléculas de tropomiosina en forma de barra situadas en los surcos y moléculas de troponina espaciadas a intervalos definidos, como se describe en el texto. Los cambios posicionales en estas proteínas que desencadenan la contracción se muestran en la figura 9-63.

Cada filamento grueso está compuesto por varios cientos de moléculas de miosina II junto con pequeñas cantidades de otras proteínas. Al igual que los filamentos que se forman *in vitro* (véase figura 9-43), la polaridad de los filamentos gruesos de las células musculares se invierte en el centro del sarcómero. El centro del filamento está compuesto por las regiones de cola opuestas de las moléculas de miosina y está desprovisto de cabezas. Las cabezas de miosina se proyectan desde cada filamento grueso a lo largo del resto de su longitud debido a la posición escalonada de las moléculas de miosina que componen el cuerpo del filamento (figura 9-43).

La tercera proteína más abundante de los músculos esqueléticos de los vertebrados es la titina, que es la proteína más grande aún por descubrir en cualquier organismo.

El gen de titina de longitud completa (que puede dar lugar a isoformas de diferente longitud) codifica un polipéptido de más de 3.5 millones de daltones en masa molecular y que contiene más de 38 000 aminoácidos. Las moléculas de titina se originan en la línea central de cada sarcómero, se extienden a lo largo del filamento de miosina y terminan en la línea Z (**FIGURA 9-51**). La titina es una proteína altamente elástica que se estira como un resorte molecular a medida que ciertas regiones dentro de la molécula se desenrollan. Se cree que la titina evita que el sarcómero se separe durante el estiramiento muscular. La titina también mantiene los filamentos de miosina en su posición correcta dentro del centro del sarcómero durante la contracción muscular.

**LA BASE MOLECULAR DE LA CONTRACCIÓN.** Después de la formulación de la hipótesis del filamento deslizante, la atención se dirigió a las cabezas de las moléculas de miosina como los componentes generadores de fuerza de la fibra muscular. Durante una contracción, cada cabeza de miosina se extiende hacia afuera y se une fuertemente a un filamento delgado, formando los puentes cruzados que se ven entre los dos tipos de filamentos (figura 9-49). Las cabezas de un único filamento de miosina interactúan con seis filamentos de actina circundantes. Si bien está estrechamente unido al filamento de actina, la cabeza de miosina experimenta un cambio conformacional (descrito a continuación) que mueve el filamento de actina delgada aproximadamente 10 nm hacia el centro del sarcómero. A diferencia de la miosina V (representada en la figura 9-44), la miosina muscular (es decir, la miosina II) es un motor no progresivo. La miosina muscular permanece en contacto con su pista, en este caso un filamento delgado, por solo una pequeña fracción (menos del 5%)

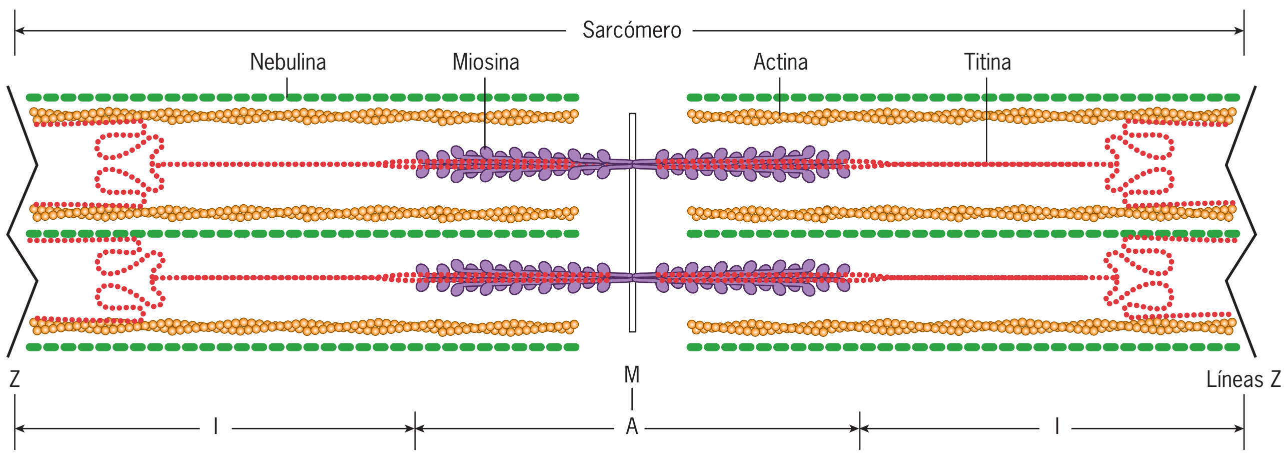



**FIGURA 9-51 La disposición de las moléculas de titina dentro del sarcómero.** Estas enormes moléculas elásticas se extienden desde el extremo del sarcómero en la línea Z hasta la banda M en el centro del sarcómero. Se cree que las moléculas de titina mantienen los filamentos gruesos en el centro del sarcómero durante la contracción. La porción de la banda I de la molécula de titina contiene dominios tipo resorte y es capaz de tener una gran elasticidad. Se cree que las moléculas de nebulina (que no se discuten en el texto) actúan como una "regla molecular" al regular el número de monómeros de actina que se pueden ensamblar en un filamento delgado.

FUENTE: TCS Keller. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:33. Current Opinion in Cell Biology por Elsevier Ltd., Current Opinion Journals. Reproducida con permiso de Elsevier Ltd., Current Opinion Journals en el formato de diario a través de copyright clearance center.

del ciclo total. Sin embargo, cada filamento delgado es contactado por un equipo de un centenar de cabezas de miosina que rompen sincronizadamente entre sí (figura 9-49*a*). En consecuencia, el filamento delgado sufre un movimiento continuo durante cada ciclo contráctil. Se estima que un único filamento delgado en una célula muscular se puede mover varios cientos de nanómetros durante un período tan corto como 50 milisegundos.

Los fisiólogos musculares han buscado durante mucho tiempo comprender cómo una sola molécula de miosina puede mover un filamento de actina de aproximadamente 10 nm en un solo golpe de poder. La publicación de la primera estructura atómica del fragmento de miosina II S1 en 1993 por Ivan Rayment, Hazel Holden y sus colegas de la Universidad de Wisconsin centró la atención en una propuesta para explicar su mecanismo de acción. En esta propuesta, la energía liberada por la hidrólisis de ATP induce un pequeño cambio conformacional (0.5 nm) dentro de la cabeza mientras esta se encuentra estrechamente unida al filamento de actina. El pequeño movimiento dentro de la cabeza se amplifica aproximadamente 20 veces por el movimiento oscilante de un cuello alfahelicoidal adyacente (**FIGURA 9-52**). De acuerdo con esta hipótesis, el cuello alargado de la miosina II actúa como un "brazo de palanca" rígido que hace que el filamento de actina unido se desplace una distancia mucho mayor de la que de otro modo sería posible. Se cree que las dos cadenas ligeras, que están envueltas alrededor del cuello, proporcionan rigidez a la palanca.

El apoyo para la propuesta "brazo de palanca" se obtuvo inicialmente a través de una serie de experimentos por James Spudich y sus colegas de la Universidad de Stanford. Estos investigadores construyeron genes que codificaban versiones alteradas de la molécula de miosina II, que contenía cuellos de diferente longitud. Las moléculas de miosina modificadas genéticamente se analizaron luego en un ensayo de motilidad *in vitro* con filamentos de actina, similar a la representada en la figura 9-42. Según lo predicho por la hipótesis del brazo de palanca, la duración aparente del golpe de poder de las moléculas de miosina fue directamente proporcional a la longitud de sus cuellos. Las moléculas de miosina con cuellos más cortos generan desplazamientos más pequeños, mientras que las que tienen cuellos más largos generan mayores desplazamientos. No todos los estudios han respaldado la correlación entre el tamaño del paso y la longitud del cuello, por lo que el papel del brazo de palanca sigue siendo motivo de controversia.

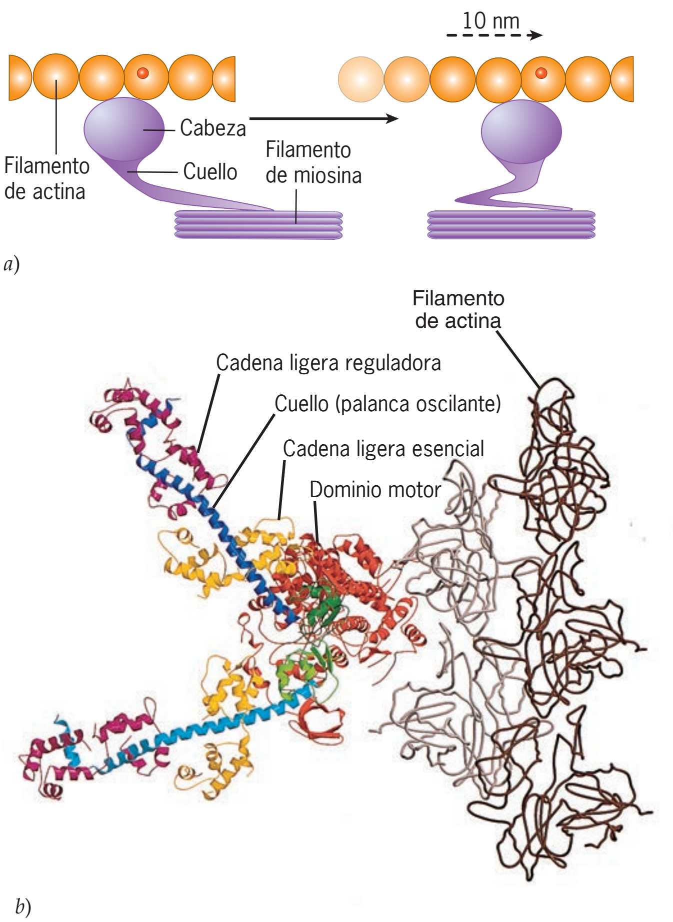



**FIGURA 9-52 Modelo del brazo de palanca oscilante de una molécula de miosina II.** *a*) Durante el golpe de poder, el cuello de la molécula de miosina se mueve a través de una rotación de aproximadamente 70°, lo que produciría un movimiento del filamento de actina de aproximadamente 10 nm. *b*) Un modelo del golpe de potencia del dominio motor de la miosina que consiste en el dominio motor (o cabeza) y el cuello contiguo (o brazo de palanca). Un filamento de actina adjunto se muestra en gris/marrón. El cuello helicoidal largo se muestra en dos posiciones, tanto antes como después del golpe de poder (representado como el cuello azul oscuro superior y el cuello azul claro inferior, respectivamente). Se piensa que este desplazamiento de la región del cuello impulsa el movimiento muscular. Las cadenas ligeras esenciales y reguladoras, que se envuelven alrededor del cuello, se muestran en amarillo y magenta, respectivamente.

FUENTE: De Malcolm Irving, *et al*. *Nature Struct Biol* 2000;7:482. Reimpreso con autorización de Macmillan Publishers, Ltd. Cortesía de Malcolm Irving, Ivan Rayment y Carolyn Cohen.

## LA ENERGÍA DEL DESLIZAMIENTO DE FILAMENTOS.

Al igual que las otras proteínas motoras, como la cinesina y la dineína, la miosina convierte la energía química del ATP en la energía mecánica del deslizamiento del filamento. Cada ciclo de actividad mecánica del puente cruzado de miosina tarda aproximadamente 50 milisegundos y va acompañado de un ciclo de actividad de ATPasa, como se ilustra en el modelo que se muestra en la **FIGURA 9-53**. Según este modelo, el ciclo comienza

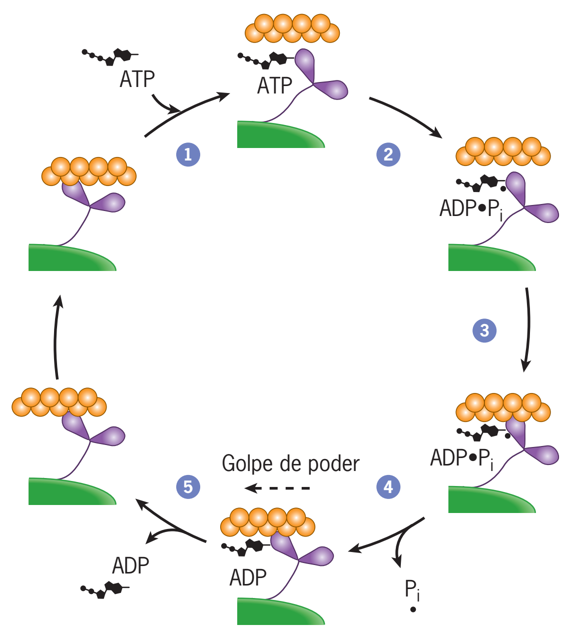



**FIGURA 9-53 Un modelo esquemático del ciclo contráctil de la actina-miosina.** El movimiento del filamento delgado por la cabeza de miosina que genera fuerza se produce como resultado de un vínculo entre un ciclo mecánico que implica la unión, el movimiento y el desprendimiento de la cabeza y un ciclo químico que implica la unión, hidrólisis y liberación de ATP, ADP y Pi. En este modelo, los dos ciclos comienzan en el paso 1 con la unión de ATP a una hendidura en la cabeza de la miosina, lo que provoca el desprendimiento de la cabeza del filamento de actina. La hidrólisis de ATP ligado (paso 2) energiza la cabeza, causando que se una débilmente al filamento de actina (paso 3). La liberación de Pi causa una unión más apretada de la cabeza de miosina al filamento delgado y la carrera de poder (paso 4) que mueve el filamento delgado hacia el centro del sarcómero. El lanzamiento de ADP (paso 5) prepara el escenario para otro ciclo.

FUENTE: MY Jiang y MP Scheetz. *Bioessays* 1994;16:532.

cuando una molécula de ATP se une a la cabeza de miosina, un evento que induce la disociación del puente cruzado del filamento de actina (figura 9-53, paso 1). La unión de ATP es seguida por su hidrólisis, que ocurre antes de que la cabeza de miosina entre en contacto con el filamento de actina. Los productos de la hidrólisis de ATP, es decir, ADP y $P_i$, permanecen unidos al sitio activo de la enzima, mientras que la energía liberada por hidrólisis es absorbida por la proteína en su conjunto (figura 9-53, paso 2). En este punto, el puente cruzado está en un estado energizado, análogo a un resorte estirado capaz de moverse espontáneamente. La miosina energizada se une a la molécula de actina (paso 3) y libera su fosfato unido, lo que desencadena un gran cambio conformacional impulsado por la energía libre almacenada (paso 4). Este cambio conformacional desplaza el filamento de actina hacia el centro del sarcómero. Este movimiento representa la carrera de poder de la cabeza de miosina como se muestra en la figura 9-52. La liberación del ADP unido (paso 5) va seguida de la unión de una nueva molécula de ATP para que pueda comenzar un nuevo ciclo. En ausencia de ATP, la cabeza de miosina permanece firmemente unida al filamento de actina. La incapacidad de los puentes cruzados de miosina para desprenderse en ausencia de ATP es la base de la condición de *rigor mortis*, la rigidez de los músculos que se produce después de la muerte.



**ACOPLAMIENTO DE EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.** Las fibras musculares se organizan en grupos denominados unidades motoras. Todas las fibras de una unidad motora están inervadas en conjunto por ramas de una sola neurona motora y se contraen simultáneamente cuando son estimuladas por un impulso transmitido a lo largo de esa neurona. El punto de contacto de un término de un axón con una fibra muscular se denomina **unión neuromuscular** (**FIGURA 9-54**, véase también figura 4-56 para una vista más cercana de la estructura de la sinapsis). La unión neuromuscular es un sitio de transmisión del impulso nervioso desde el axón a través de una hendidura sináptica a la fibra muscular, cuya membrana plasmática también es excitable y capaz de conducir un potencial de acción.

Los pasos que vinculan la llegada de un impulso nervioso a la membrana plasmática del músculo con el acortamiento de los sarcómeros en las profundidades de la fibra muscular constituyen un proceso denominado **acoplamiento de excitación-contracción**. A diferencia de una neurona, donde un potencial de acción permanece en la superficie celular, el impulso generado en una célula del músculo esquelético se propaga hacia el interior de la célula a lo largo de pliegues membranosos llamados **túbulos transversales** (**T,** *transverse*) (figura 9-54). Los túbulos T terminan muy cerca de un sistema de membranas citoplásmicas que forman el **retículo sarcoplásmico** (**SR,** *sarcoplasmic reticulum*), que forma una manga membranosa alrededor de la miofibrilla. Aproximadamente 80% de la proteína integral de la membrana SR consiste en una bomba de $Ca^{2+}$-ATPasa, cuya función es transportar el $Ca^{2+}$ fuera del citosol y hacia el lumen del SR, donde se almacena hasta que se necesite.

La importancia del calcio en la contracción muscular se demostró por primera vez en 1882 por Sydney Ringer, un médico inglés. Ringer descubrió que un corazón de rana aislado se contraería en una solución salina hecha con agua corriente de Londres, pero no se contrajo en una solución hecha con agua destilada. Ringer determinó que los iones de calcio presentes en el agua del grifo eran un factor esencial en la contracción muscular. En el estado relajado, los niveles de $Ca^{2+}$ dentro del citoplasma de una fibra muscular son muy bajos (aproximadamente $2 \times 10^{-7}$ M), por debajo del umbral de concentración requerido para la contracción. Con la llegada de un potencial de acción a través de los túbulos transversales, se abren los canales de calcio en la membrana SR, y el calcio se difunde fuera del compartimiento SR y en

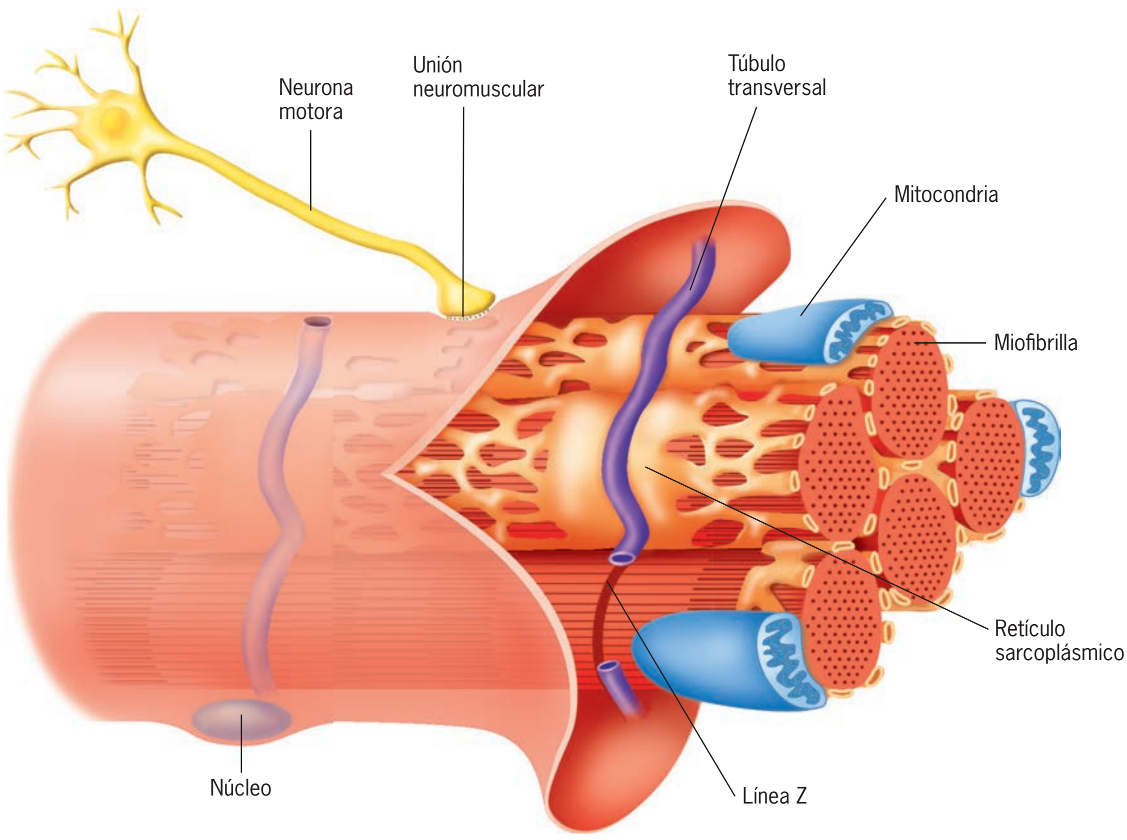



**FIGURA 9-54 La anatomía funcional de una fibra muscular.** El calcio se encuentra en la elaborada red de membranas internas que componen el retículo sarcoplásmico (SR). Cuando un impulso llega por medio de una neurona motora, se lleva al interior de la fibra a lo largo de la membrana del túbulo transverso a la SR. Las compuertas de calcio de la SR se abren, liberando calcio en el citosol. La unión de los iones de calcio a las moléculas de troponina de los filamentos delgados conduce a los eventos descritos en la siguiente figura y a la contracción de la fibra.

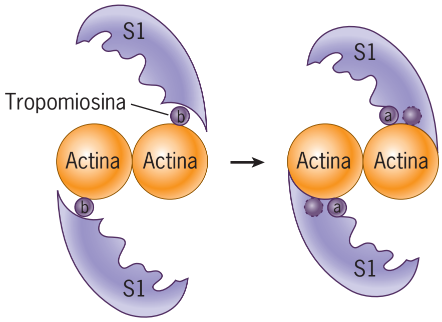



**FIGURA 9-55 El papel de la tropomiosina en la contracción muscular.** Diagrama esquemático del modelo de impedimento estérico en el que el sitio de unión a la miosina en los filamentos de actina delgada está controlado por la posición de la molécula de tropomiosina. Cuando aumentan los niveles de calcio, la interacción entre el calcio y la troponina (no mostrada) conduce a un movimiento de la tropomiosina desde la posición b hasta la posición a, que expone el sitio de unión a la miosina en el filamento delgado a la cabeza de miosina.

la corta distancia de las miofibrillas. Como resultado, los niveles de $Ca^{2+}$ intracelular se elevan a aproximadamente $5 \times 10^{-5}$ M. Para comprender cómo los niveles elevados de calcio desencadenan la contracción en una fibra de músculo esquelético, es necesario reconsiderar la composición proteica de los filamentos delgados.

Cuando el sarcómero se relaja, las moléculas de tropomiosina de los filamentos delgados (véase figura 9-50) bloquean los sitios de unión a la miosina en las moléculas de actina. La posición de la tropomiosina dentro del surco está bajo el control de la molécula de troponina unida. Cuando los niveles de $Ca^{2+}$ aumentan, estos iones se unen a una de las subunidades de troponina (troponina C), causando un cambio conformacional en otra subunidad de la molécula de troponina. Al igual que el colapso de una fila de dominó, el movimiento de la troponina se transmite a la tropomiosina adyacente, que se mueve aproximadamente 1.5 nm más cerca del centro del surco del filamento (desde la posición b en la **FIGURA 9-55**). Este cambio en la posición de la tropomiosina expone los sitios de unión a la miosina en las moléculas de actina adyacentes, lo que permite que las cabezas de miosina se adhieran a los filamentos delgados. Cada molécula de troponina controla la posición de una molécula de tropomiosina, que a su vez controla la capacidad de unión de siete subunidades de actina en el filamento delgado.

Una vez que cesa la estimulación de la fibra nerviosa motora inervada, los canales de $Ca^{2+}$ en la membrana SR se cierran, y las moléculas de $Ca^{2+}$-ATPasa en esa membrana eliminan el exceso de calcio del citosol. A medida que disminuye la concentración de $Ca^{2+}$, estos iones se disocian de sus sitios de unión en la troponina, lo que hace que las moléculas de tropomiosina vuelvan a su posición en la que bloquean la interacción entre la actina y la miosina. Se puede pensar que el proceso de relajación es una competencia por el calcio entre la proteína de transporte de la membrana SR y la troponina. La proteína de transporte tiene una mayor afinidad por el ion, por lo que preferentemente lo elimina del citosol, dejando las moléculas de troponina sin calcio unido.

**REPASO**

1. Describa la estructura del sarcómero de una miofibrilla del músculo esquelético y los cambios que ocurren durante su contracción.
2. Describa los pasos que ocurren entre el momento en que un impulso nervioso se transmite a través de una unión neuromuscular hasta el momento en que la fibra muscular comienza a acortarse. ¿Cuál es el papel de los iones de calcio en este proceso?

## 9.13 Las proteínas de unión a la actina

Las estructuras altamente ordenadas que se ven en las células musculares representan una forma en que las redes de actina se pueden organizar en las células para orquestar la contractilidad y el movimiento. Las redes de actina también pueden formar arreglos transitorios más lábiles que pueden impulsar a las células a gatear, como amebas, a lo largo de un sustrato. Estas estructuras se ven típicamente en la corteza celular, una región delgada debajo de la membrana plasmática.

La corteza es una región activa de la célula, responsable de procesos tales como la ingestión de materiales extracelulares, la extensión de procesos durante el movimiento celular y la constricción de una sola célula animal en dos células durante la división celular. Todos estos procesos dependen del ensamblaje de los filamentos de actina en la corteza. En las siguientes páginas, consideraremos una serie de ejemplos de motilidad celular basada en actina. Primero, sin embargo, es importante estudiar los factores que regulan las redes de actina que no son musculares.

La actina purificada puede polimerizarse *in vitro* para formar filamentos de actina, pero estos no pueden interactuar entre sí o realizar actividades útiles. Bajo el microscopio, se parecen a los pedazos de paja esparcidos en el piso de un granero. Por el contrario, los filamentos de actina en las células vivas están organizados en una variedad de patrones, que incluyen varios tipos de haces así como redes reticuladas y ramificadas (**FIGURA 9-56**). La organización y el comportamiento de los filamentos de actina dentro de las células se determinan mediante la interacción de actina con una variedad notable de **proteínas de unión a actina**. Estas proteínas afectan el ensamblaje localizado o el desmontaje de los filamentos de actina, sus propiedades físicas y sus interacciones entre sí y con los organelos celulares. Se han aislado

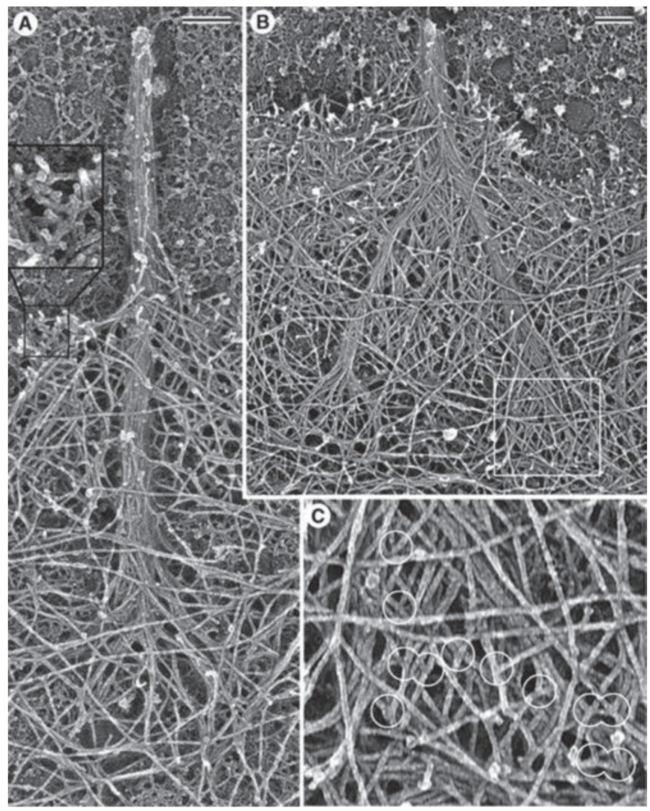



**FIGURA 9-56 Dos disposiciones diferentes de filamentos de actina dentro de una célula.** Esta micrografía electrónica del lamelipodio de una célula móvil muestra filamentos de actina dispuestos en un paquete paralelo denso, llamado filopodium (arriba), así como una red dendrítica reticulada en el lamelipodio (mitad inferior).

FUENTE: Cortesía de Tatyana Svitkina, Universidad de Pennsylvania.

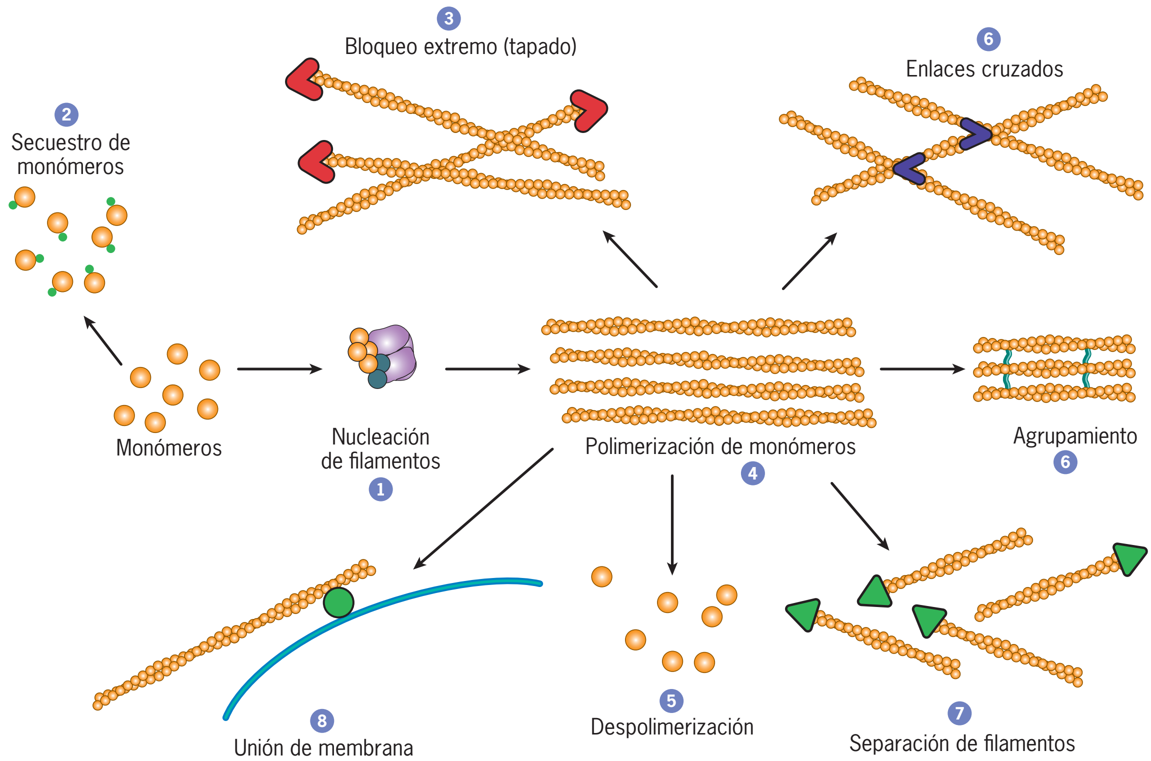



**FIGURA 9-57 Las funciones de las proteínas de unión a actina.**

más de 100 proteínas de unión a actina diferentes pertenecientes a numerosas familias de diversos tipos de células. Las proteínas de unión a actina se pueden dividir en varias categorías según su función presunta en la célula (**FIGURA 9-57**).[4]

1. *Proteínas de nucleación*. El paso más lento en la formación de un filamento de actina es el primer paso, la nucleación, que requiere que al menos tres monómeros de actina se unan en la orientación adecuada para comenzar la formación del polímero. Este es un proceso muy desfavorable para que las moléculas de actina se dejen solas. Como se señaló anteriormente, la formación de un filamento de actina se acelera por la presencia de una semilla o núcleo preexistente al que se pueden agregar monómeros (como en la figura 9-39*a*). En la célula, se han encontrado varios nucleantes de actina que pueden mejorar enormemente la velocidad a la que se forman los polímeros a partir de los monómeros de actina. El mejor estudiado es el complejo Arp2/3, que contiene dos "proteínas relacionadas con actina" (o Arps) —proteínas que comparten una considerable homología de secuencia con las actinas, pero que no se consideran actinas "verdaderas". Arp2/3 se activa uniéndose al lado de un filamento de actina y a una proteína activadora, lo que hace que los dos Arps adopten una conformación que proporcione una plantilla a la que se pueden agregar los monómeros de actina, análoga a la forma en que la gammatubulina se propuso formar una plantilla para la nucleación de microtúbulos (figura 9-14*c*). Como se muestra en la figura 9-62, el complejo Arp2/3 genera redes de filamentos de actina ramificados. Otra familia de las proteínas de nucleación, las forminas, generan filamentos no ramificados, como los que se encuentran en las adherencias focales (sección 7.6) y los anillos contráctiles de las células en división (sección 14.11). A diferencia de Arp2/3, que permanece en el extremo puntiagudo del filamento recién formado, las forminas, con el extremo con púas incluso cuando se insertan nuevas subunidades en ese sitio. Por tanto, no solo las forminas nuclean los filamentos de actina, sino que también pueden promover el alargamiento muy rápido de los filamentos que ayudaron a crear. Otra clase de nucleadores de actina, cuyo miembro fundador es la proteína Spire, contiene un grupo de dominios de unión a actina y monómero que se cree que unen múltiples monómeros de actina para formar un núcleo de actina.
2. *Proteínas para secuestro de monómeros*. Las timosinas son proteínas que se unen a los monómeros de actina-ATP y evitan que se polimericen. Las proteínas con esta actividad se describen como proteínas para secuestro de monómeros de actina. Se cree que estas proteínas son responsables de la concentración relativamente alta de actina monomérica en células no musculares (50-200 mM). Sin proteínas para secuestro de monómeros, las condiciones dentro del citoplasma favorecerían la polimerización casi completa de los monómeros de actina solubles en filamentos. Debido a su capacidad para unirse a la actina monomérica y estabilizar el conjunto de monómeros, los cambios en la concentración o actividad de las proteínas para secuestro de monómeros pueden desplazar el equilibrio monómero-polímero en una determinada región de una célula y determinar si la polimerización o despolimerización se favorece en ese momento.
3. *Proteínas que bloquean o tapan*. Las proteínas de este grupo regulan la longitud de los filamentos de actina uniéndose a uno u otro extremo de los filamentos, formando un tapón que bloquea tanto la pérdida como la ganancia de las subunidades. Si el extremo de púas de un filamento de crecimiento rápido está tapado, la despolimerización puede proceder en el extremo opuesto, lo que da como resultado el desensamblaje del filamento. Si el extremo puntiagudo también está tapado, la despolimerización está bloqueada. Los filamentos delgados de músculo estriado están tapados en su extremo con púas en la línea Z por una proteína llamada capZ y en su extremo

[4] Cabe señalar que algunas de estas proteínas pueden llevar a cabo más de uno de los tipos de actividades enumeradas, dependiendo de la concentración de proteína de unión a actina y las condiciones predominantes (p. ej., la concentración de $Ca^{2+}$ y $H^{+}$). La mayoría de los estudios de estas proteínas se llevan a cabo *in vitro*, y a menudo es difícil extender los resultados a actividades dentro de la célula.

puntiagudo por la proteína tropomodulina. Si la tropomodulina cap se ve alterada por la microinyección de anticuerpos en una célula muscular, los filamentos finos añaden más subunidades de actina en su extremo puntiagudo recién expuesto y experimentan una elongación espectacular en el centro del sarcómero.

4. *Proteínas de unión a monómeros*. La profilina es una pequeña proteína abundante que se une al mismo sitio que la timosina en un monómero de actina. Sin embargo, en lugar de inhibir la polimerización, la profilina promueve el crecimiento de los filamentos de actina. La profilina lo hace uniéndose a un monómero de actina y catalizando la disociación de su ADP unido, que se reemplaza rápidamente por ATP. El monómero profilina-ATP-actina se puede ensamblar en el extremo libre de púas de un filamento de actina en crecimiento, lo que conduce a la liberación de profilina. Los miembros de la familia de proteínas Ena/VASP también promueven el alargamiento de filamentos en el extremo de púas.
5. *Proteínas despolimerizadoras*. Los miembros de la familia de las proteínas cofilinas (que incluyen cofilina, ADF y depactina) se unen a las subunidades de actina-ADP presentes en el cuerpo y en el extremo puntiagudo de los filamentos de actina (véase figura 18-33). La cofilina tiene dos actividades aparentes: puede fragmentar filamentos de actina y promover su despolimerización en el extremo puntiagudo. Estas proteínas desempeñan un papel en el rápido cambio de filamentos de actina en sitios de cambios dinámicos en la estructura del citoesqueleto. Son esenciales para la locomoción celular, la fagocitosis y la citoquinesis.
6. *Proteínas que forman enlaces cruzados*. Las proteínas de este grupo pueden alterar la organización tridimensional de una población de filamentos de actina. Cada una de estas proteínas tiene dos o más sitios de unión a actina y, por tanto, pueden conectar dos o más filamentos de actina separados. Algunas de estas proteínas (p. ej., filamina) tienen la forma de una barra larga y flexible y promueven la formación de redes sueltas de filamentos interconectados en ángulos rectos entre sí (como en la figura 9-56). Las regiones del citoplasma que contienen tales redes tienen las propiedades de un gel elástico tridimensional que resiste las presiones mecánicas locales. Otras proteínas que forman enlaces cruzados (p. ej., vilina y fimbrina) tienen una forma más globular y promueven la agrupación de filamentos de actina en matrices paralelas estrechamente tejidas. Tales matrices se encuentran en las microvellosidades que se proyectan desde ciertas células epiteliales (**FIGURA 9-58**) y en los estereocilios en forma de pelo (figura 9-46) que se proyectan desde las células receptoras del oído interno. Agrupar los filamentos aumenta su rigidez, lo que les permite actuar como un esqueleto interno de apoyo para estas proyecciones citoplásmicas.
7. *Proteínas cortadoras de filamentos*. Las proteínas de esta clase tienen la capacidad de unirse al lado de un filamento existente y partirlo en dos. La ruptura de proteínas (p. ej., gelsolina) también puede promover la incorporación de monómeros de actina creando extremos de púas libres adicionales, o pueden limitar los fragmentos que generan. Como se indica en la figura 9-63, la cofilina también es capaz de cortar filamentos.
8. *Proteínas que se unen a la membrana*. Gran parte de la maquinaria contráctil de las células no musculares se encuentra justo debajo de la membrana plasmática. Durante numerosas actividades, las fuerzas generadas por las proteínas contráctiles actúan sobre la membrana plasmática, haciendo que sobresalga (como ocurre, por ejemplo, durante la locomoción celular) o invagine (como ocurre, por ejemplo, durante la fagocitosis o citoquinesis). Estas actividades por lo general se facilitan al unir indirectamente los filamentos de actina a la membrana plasmática, mediante la unión a una proteína de membrana periférica. Se describieron dos ejemplos en capítulos anteriores: la inclusión de polímeros de actina corta en el esqueleto de membrana de eritrocitos (véase figura 4-32*d*) y la unión de filamentos de actina a la membrana en adherencias focales y uniones adherentes (véanse figuras 7-17 y 7-26). Las proteínas que unen membranas con actina incluyen la vinculina, miembros de la familia ERM (ezrina, radixina y moesina) y miembros de la familia de espectrina (incluida la distrofina, la proteína responsable de la distrofia muscular).

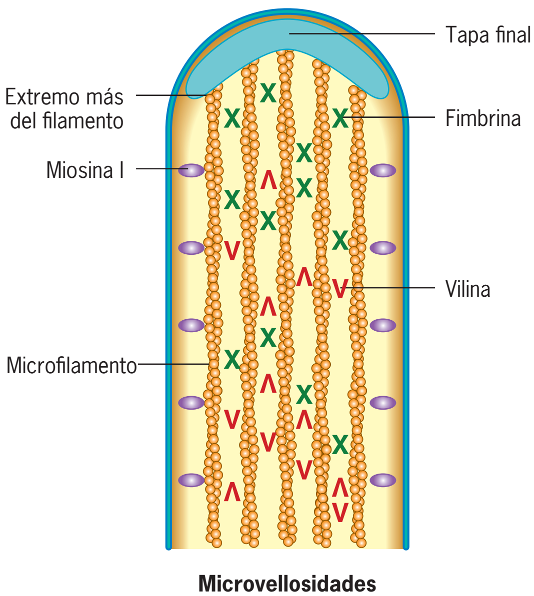



**FIGURA 9-58 Filamentos de actina y proteínas de unión a actina en una microvellosidad.** Las microvellosidades están presentes en la superficie apical de los epitelios que funcionan en la absorción de solutos, como el revestimiento del intestino y la pared del túbulo renal. Los filamentos de actina se mantienen en una disposición altamente ordenada mediante la unión de las proteínas vilina y fimbrina. El rol de la miosina I, que está presente entre la membrana plasmática de la microvellosidad y los filamentos de actina periférica, aún no está claro.

**REPASO**

1. Enumere los diversos tipos de proteínas de unión a actina y una función de cada tipo.

## 9.14 Motilidad celular

Los filamentos de actina, que a menudo trabajan de conjunto con motores de miosina y las proteínas de unión a actina descritas anteriormente, son responsables de una variedad de actividades dinámicas en células no musculares, que incluyen citoquinesis, fagocitosis, transmisión citoplásmica (el flujo volumétrico dirigido del citoplasma que se produce en ciertas células vegetales grandes), tráfico de vesículas, activación de plaquetas sanguíneas, movimientos laterales de proteínas integrales dentro de las membranas, interacciones célula-sustrato, locomoción celular, crecimiento axonal y cambios en la forma de las células. La movilidad celular se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

La locomoción celular es necesaria para muchas actividades en vertebrados superiores, incluido el desarrollo de tejidos y órganos, la formación de vasos sanguíneos, el desarrollo de axones, la curación de heridas y la protección contra infecciones. La locomoción celular también contribuye a la diseminación de tumores cancerosos. En la siguiente discusión, nos concentraremos en estudios de células cultivadas que se mueven sobre un sustrato plano

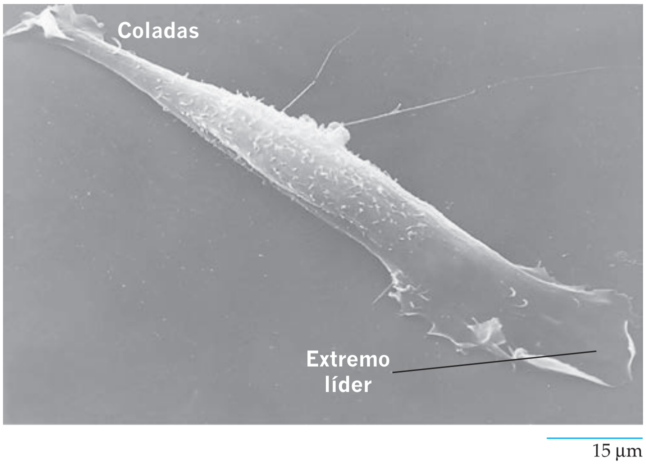



**FIGURA 9-59 Microfotografía electrónica de barrido de un fibroblasto de ratón que se arrastra sobre la superficie de un plato de cultivo.** El borde anterior de la celda se extiende a un lamelipodio aplanado cuya estructura y función se discuten más adelante en este capítulo.

FUENTE: De Guenter Albrecht-Buehler. *Int Rev Cytol* 1990;120:194.

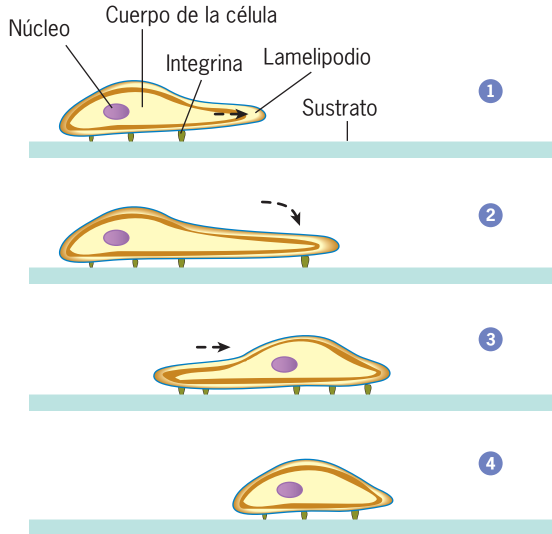



**FIGURA 9-60 La secuencia repetitiva de actividades que ocurre cuando una célula se arrastra sobre el sustrato.** El paso 1 muestra la protuberancia del borde anterior de la celda en forma de lamelipodio. El paso 2 muestra la adhesión de la superficie inferior del lamelipodio al sustrato, una unión que está mediada por integrinas que residen en la membrana plasmática. La celda usa este accesorio para agarrar el sustrato. El paso 3 muestra el movimiento del bulto de la celda hacia delante sobre el sitio de fijación, que permanece relativamente estacionario. Este movimiento se logra mediante una fuerza contráctil (tracción) ejercida contra el sustrato. El paso 4 muestra la celda después de que los accesorios posteriores con el sustrato se cortaron y la porción posterior de la celda se ha movido hacia adelante.

(es decir, bidimensional) porque estas son las condiciones experimentales que han dominado este campo de investigación. Tenga en cuenta que las células del cuerpo no se mueven sobre sustratos planos y desnudos, y cada vez hay más pruebas de que algunos de los hallazgos de estos estudios pueden no aplicarse a las células que atraviesan terrenos más complicados. Recientemente, los investigadores han comenzado a desarrollar sustratos más complejos, incluidos varios tipos de matrices extracelulares tridimensionales (véase figura 18-22), que pueden conducir a nuevos conocimientos sobre algunos de los aspectos del mecanismo de la locomoción celular que se analizan a continuación.

La **FIGURA 9-59** muestra un único fibroblasto que estaba en proceso de moverse hacia la esquina inferior derecha del campo cuando se preparó para microscopía. La locomoción celular, tal como la exhiben los fibroblastos en la figura 9-59, comparte propiedades con otros tipos de locomoción, por ejemplo, caminar. A medida que camina, su cuerpo realiza una serie de actividades repetitivas: primero, una pierna se extiende en la dirección de la locomoción; segundo, la parte inferior de su pie hace contacto con el suelo, que actúa como un punto de adhesión temporal; tercero, la fuerza es generada por los músculos de tus piernas que mueven todo tu cuerpo hacia adelante más allá del pie estacionario, mientras generan tracción contra el punto de adhesión; cuarto, tu pie, que ahora está detrás de tu cuerpo en vez de estar frente a él, se levanta del suelo en anticipación de su próximo paso. Aunque las células móviles pueden adoptar formas muy diferentes a medida que se arrastran sobre un sustrato, muestran una secuencia similar de actividades (**FIGURA 9-60**). 1) El movimiento se inicia por la protrusión de una parte de la superficie de la célula en la dirección en que se moverá la célula. 2) Una porción de la superficie inferior de la protrusión se une al sustrato, formando sitios temporales de anclaje. 3) La mayor parte de la célula se estira hacia adelante sobre los contactos adhesivos, que eventualmente se convierten en parte del segmento posterior de la celda. 4) La célula rompe sus contactos posteriores con el sustrato, lo que causa la retracción del borde posterior, o "cola".

Cuando se coloca una pequeña pieza de tejido vivo, como la piel o el hígado, en un plato de cultivo en un medio de cultivo apropiado, las células individuales migran fuera de la muestra y sobre la superficie del plato. El examen de estas células bajo el microscopio generalmente muestra que son fibroblastos, que son las células predominantes presentes en el tejido conectivo (véase figura 7-1). A medida que se mueve, un fibroblasto se aplana cerca del sustrato y se convierte en abanico, con un extremo frontal ensanchado y una "cola" estrecha (como en la figura 9-59). Su movimiento es errático y desigual, a veces avanza y otras veces se retira. En un buen día, un fibroblasto puede moverse una distancia de aproximadamente 1 mm. La clave de la locomoción del fibroblasto se ve al examinar su borde anterior, que se extiende desde la célula como una protrusión ancha, aplanada y en forma de velo, llamada **lamelipodio** (**FIGURA 9-61*a***). Los lamelipodios suelen estar desprovistos de vesículas citoplásmicas y otras estructuras particuladas, y el borde exterior a menudo muestra un movimiento ondulante, lo que le confiere un aspecto ondulado (figura 9-61*b*). Como un lamelipodio se extiende desde la célula, se adhiere al sustrato subyacente en puntos específicos, proporcionando sitios temporales de anclaje para que la célula se estire.

Veremos en la sección 9-15 cómo la polimerización de los monómeros de actina puede proporcionar la fuerza que impulsa a una bacteria *Listeria* a través del citoplasma. Este tipo de movimiento intracelular se logra sin la participación de motores moleculares. Se cree que un tipo similar de mecanismo de polimerización de actina proporciona la fuerza móvil requerida para la protrusión del borde delantero de un lamelipodio. Este tipo de motilidad también demuestra la importancia de las proteínas de unión a actina (representadas en la figura 9-57) para orquestar el ensamblaje y el desensamblaje de las redes de filamentos de actina en un sitio particular dentro de la célula en un momento particular.

Supongamos que comenzamos con un glóbulo blanco redondeado que recibe una señal química proveniente de una dirección particular donde el cuerpo ha sido infectado. Una vez que se recibe el estímulo en la membrana plasmática, desencadena la polimerización localizada de la actina, que conduce a la polarización de la célula y su movimiento hacia la fuente del estímulo (**FIGURA 9-62*a***).[5] Así como *Listeria* tiene una proteína (ActA) que

[5] Este tipo de respuesta se puede ver en una película notable en la web que muestra un neutrófilo persiguiendo a una bacteria. Se puede encontrar usando las palabras de búsqueda: "rastreo de neutrófilos".

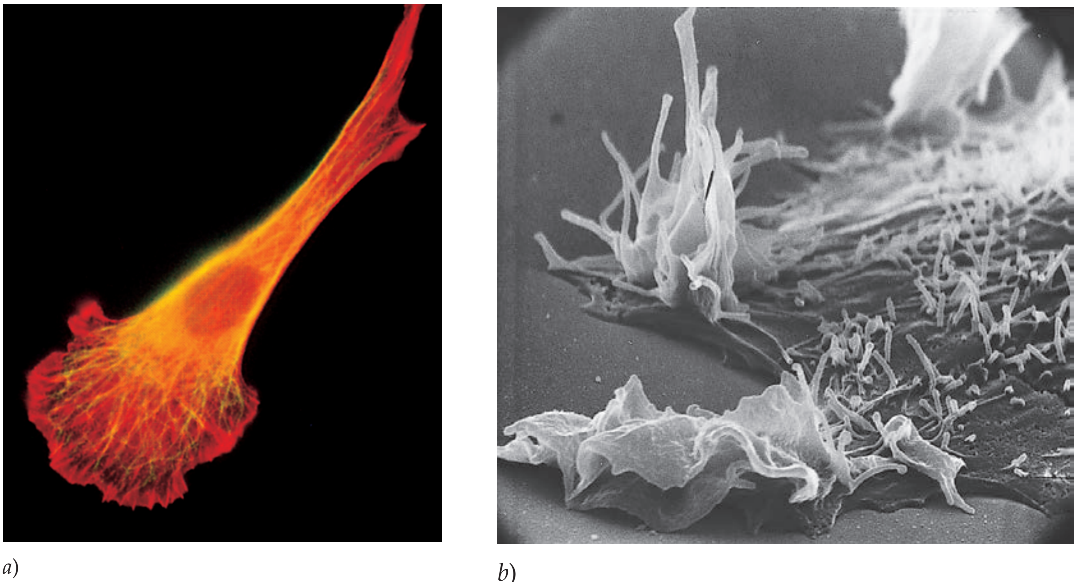



**FIGURA 9-61 El borde de ataque de una celda móvil.** *a*) El borde anterior de este fibroblasto móvil se aplana contra el sustrato y se extiende hacia un lamelipodio en forma de velo. *b*) Microfotografía electrónica de barrido del borde delantero de una célula cultivada, que muestra las membranas onduladas del lamelipodio.

FUENTE: *a*) Cortesía de J Victor. *Pequeña*; *b*) De Jean Paul Revel. *Symp Soc Exp Biol* 28:4.

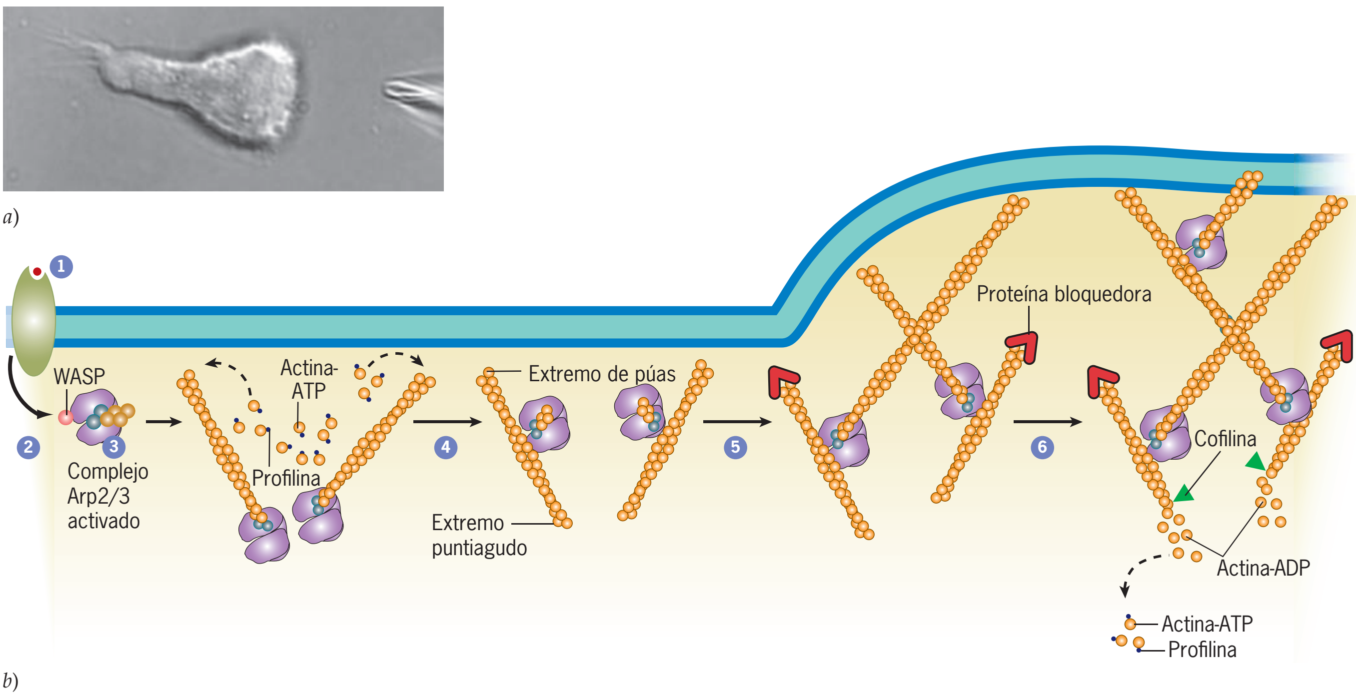



**FIGURA 9-62 Motilidad celular dirigida.** *a*) Micrografía de un glóbulo blanco (un neutrófilo) que ha respondido a un quimioatrayente administrado por una pipeta (se ve a la derecha). La célula se ha polarizado y se está moviendo hacia la fuente del estímulo. *b*) Un mecanismo propuesto para el movimiento de una celda de una manera dirigida. Se recibe un estímulo en la superficie de la célula (paso 1) que conduce a la activación del complejo Arp2/3 por un miembro de la familia WASP/WAVE (paso 2). Los complejos de Arp2/3 activados sirven como sitios de nucleación para la formación de nuevos filamentos de actina (paso 3). Una vez que se han formado los filamentos, los complejos Arp2/3 se unen a los lados de los filamentos (paso 4), lo que estimula su actividad de nucleación. Como resultado, los complejos de Arp2/3 unidos inician ramificaciones laterales que se extienden hacia fuera (paso 5) en un ángulo de aproximadamente 70° con respecto a los filamentos existentes a los que están anclados. A medida que estos filamentos se polimerizan, se cree que empujan la membrana plasmática hacia afuera, dando como resultado la extensión del borde anterior del lamelipodio. Mientras tanto, el extremo con púas de los filamentos previamente formados están unidos por una proteína de protección, lo que impide un mayor crecimiento de estos filamentos, manteniéndolos cortos y rígidos. Eventualmente, los extremos puntiagudos de los filamentos de actina preexistentes más viejos se someten a despolimerización, liberando subunidades de ADP-actina (paso 6). La despolimerización es promovida por la cofilina, que se une a las subunidades de ADP-actina dentro del filamento y estimula la disociación de las subunidades del extremo puntiagudo del filamento. Las subunidades liberadas se unen a la profilina y se recargan mediante el intercambio ATP/ADP, lo que las prepara para participar en la polimerización de actina (como en el paso 3). (Una discusión sobre la validez de este modelo se puede encontrar en Trends Cell Biol 2011;21:2 y Nature Cell Biol 2011;13:1012).

FUENTE: *a*) Tomada de Carole A Parent. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:5. © 2004, con permiso de Elsevier.

activa la polimerización en la superficie de las células bacterianas, las células de mamíferos tienen una familia de proteínas (la familia WASP/WAVE) que activa el complejo Arp2/3 en el sitio de estimulación cerca de la membrana plasmática. WASP, el miembro fundador de la familia, fue descubierto como el producto de un gen responsable del síndrome de Wiskott-Aldrich. Los pacientes con este trastorno tienen un sistema inmune debilitado porque sus glóbulos blancos carecen de una proteína WASP funcional y, en consecuencia, no responden a las señales quimiotácticas.

La figura 9-62*b* representa un modelo de los principales pasos en la formación de un lamelipodio que guiaría a una célula en una dirección particular. Se recibe un estímulo en un extremo de la célula (paso 1, figura 9-62*b*), que conduce a la activación de los complejos proteicos Arp2/3 por las proteínas WASP activadas (paso 2). En su estado activado, el complejo Arp2/3 se une al lado de un filamento de actina existente y también adopta una conformación que se asemeja al extremo con púas de un filamento de actina. Como resultado, los monómeros de ATP-actina libres se unen al molde de Arp2/3, lo que conduce a la formación de un nuevo filamento de actina ramificada (paso 3). La polimerización de los monómeros de actina unidos a ATP sobre los extremos libres de púas de los filamentos en crecimiento es promovida por moléculas de profilina (p. 353). Otros complejos de Arp2/3 pueden unirse a los lados de estos nuevos filamentos (paso 4) y nuclear la formación de ramas de actina adicionales (paso 5). Los complejos Arp2/3 permanecen en los extremos apuntados, que están situados en los puntos de ramificación. Mientras tanto, el crecimiento de los extremos con púas de los filamentos más viejos se bloquea mediante la adición de proteína de protección (paso 5). Por el contrario, la adición de subunidades de actina a los extremos con púas de filamentos formados más recientemente de la red empuja la membrana del lamelipodio hacia fuera en la dirección del estímulo atractivo (pasos 5 y 6). A medida que los filamentos más nuevos crecen mediante la adición de subunidades a sus extremos con púas, los filamentos con tapa más viejos se desensamblan desde sus extremos puntiagudos (paso 6). El desensamblaje es promovido por la cofilina, que se une a las subunidades de actina ADP a lo largo de los filamentos (paso 6). Las subunidades de actina-ADP liberadas de los filamentos de desensamblaje se recargan en monómeros de actina-ATP mediante la acción de profilina, y luego pueden reutilizarse en el ensamblaje de nuevos filamentos de actina en el borde de ataque.

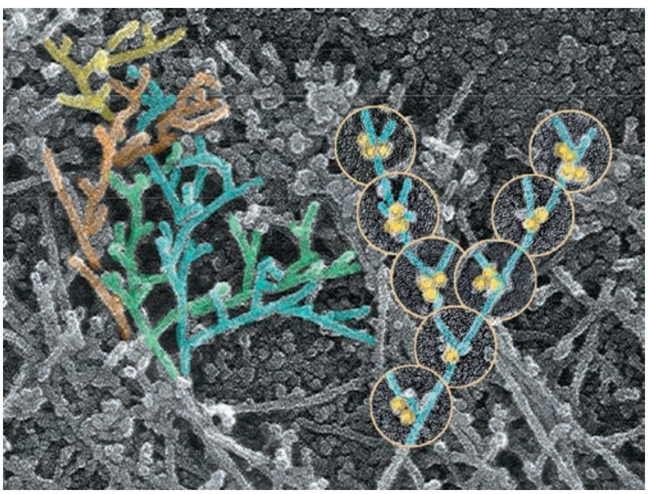


**FIGURA 9-63 La base estructural de la extensión lamelipodial.** Microfotografía electrónica de una réplica del citoesqueleto en el borde de ataque de un fibroblasto de ratón móvil. Se ve que los filamentos de actina están dispuestos en una red ramificada, que ha sido coloreada para indicar "árboles" individuales. Los insertos circulares muestran una sucesión de uniones en forma de Y entre los filamentos de actina ramificados. Los complejos Arp2/3 están localizados en la base de cada rama por anticuerpos unidos a partículas de oro coloidal (amarillo).

FUENTE: De Tatyana M Svitkina y Gary G Borisy. *J Cell Biol* 1999;(145):5; Reproducida con permiso de la prensa de la Universidad Rockefeller.

La **FIGURA 9-63** ilustra algunas de las principales características estructurales de la locomoción celular. La micrografía electrónica de la figura 9-63 muestra la naturaleza ramificada y reticulada de la actina filamentosa que reside justo debajo de la membrana plasmática de un lamelipodio que avanza. Las inserciones circulares en la figura 9-63 muestran una sucesión de ramas cortas de filamento de actina, con complejos Arp2/3 resaltados por el etiquetado de inmuno-oro. Se ve que los complejos Arp2/3 residen en las uniones con forma de Y en las que los filamentos recién polimerizados se han ramificado de los filamentos preexistentes.

El movimiento lamelipodial es un proceso dinámico. Como la polimerización y la ramificación del filamento de actina continúan en el borde frontal del lamelipodio, los filamentos de actina montados fluyen hacia atrás y luego se despolimerizan hacia la parte posterior del lamelipodio (paso 6, figura 9-62). Así tomado en su conjunto, todo el conjunto de filamentos de actina se somete a un tipo de efecto noria o movimiento rodante (p. 340), en el que las subunidades de actina se agregan a los extremos con púas de la matriz en su extremo frontal y se pierden de los extremos puntiagudos del conjunto hacia la parte posterior.

De acuerdo con la secuencia de eventos representada en la figura 9-62, la protrusión del borde anterior es seguida por el movimiento del grueso de la celda. Las principales fuerzas involucradas en la locomoción celular son aquellas generadas en los sitios de adhesión que se requieren para tirar o "remolcar" el cuerpo principal de la célula hacia adelante (paso 3 de la figura 9-60). A menudo se describen como "fuerzas de tracción" porque ocurren en sitios donde la célula se agarra al sustrato. Cuando se permite que las células migren sobre una lámina delgada de material elástico, los movimientos de la celda van acompañados por la deformación del sustrato subyacente (véase figura 7-18). La magnitud de las fuerzas de tracción ejercidas en diversas ubicaciones dentro de una célula migrante viva puede calcularse a partir de los patrones dinámicos de la deformación del sustrato y retratarse como se muestra en la **FIGURA 9-64*a*)**. Como se ve por el examen de esta imagen computarizada de un fibroblasto migratorio, las mayores fuerzas de tracción se ejercen justo detrás del borde de ataque de la célula donde esta se adhiere fuertemente al sustrato subyacente. La presencia de estos sitios de unión se revela mejor al seguir la localización de la vinculina marcada fluorescentemente, un componente principal de las adhesiones focales, dentro de una célula viva. Esto permite a los investigadores visualizar específicamente estructuras donde la célula hace contacto con el sustrato subyacente. La figura 9-64*b* muestra una micrografía de fluorescencia que muestra la presencia de moléculas de vinculina fluorescentes rojas concentradas justo detrás del borde delantero de una célula migratoria. Los sitios que contienen vinculina donde el borde anterior de una célula migrante se adhiere al sustrato tienden a ser más pequeños y simples que las adherencias focales maduras observadas en las células cultivadas estacionarias, altamente extendidas, y a menudo se les denomina complejos focales. Se cree que las fuerzas de tracción se generan en el citoesqueleto de actina asociado con estos sitios de adhesión y luego se transmiten al sustrato extracelular por medio de las moléculas de integrina transmembrana que conectan el interior y el exterior de la célula. Los complejos focales que se forman cerca del borde de ataque de una célula móvil se desmontan a medida que la célula avanza o madura en adhesiones focales más grandes y contráctiles. La maduración de los complejos focales es probablemente estimulada por la tensión ejercida sobre estos sitios de adhesión.

Una gran cantidad de evidencia indica que la polimerización de actina es responsable de empujar el borde anterior de una célula hacia afuera (paso 1, figura 9-60), mientras que la miosina (junto con filamentos de actina) es responsable de tirar hacia adelante el resto de la célula (paso 3, figura 9-60). Estos papeles con-

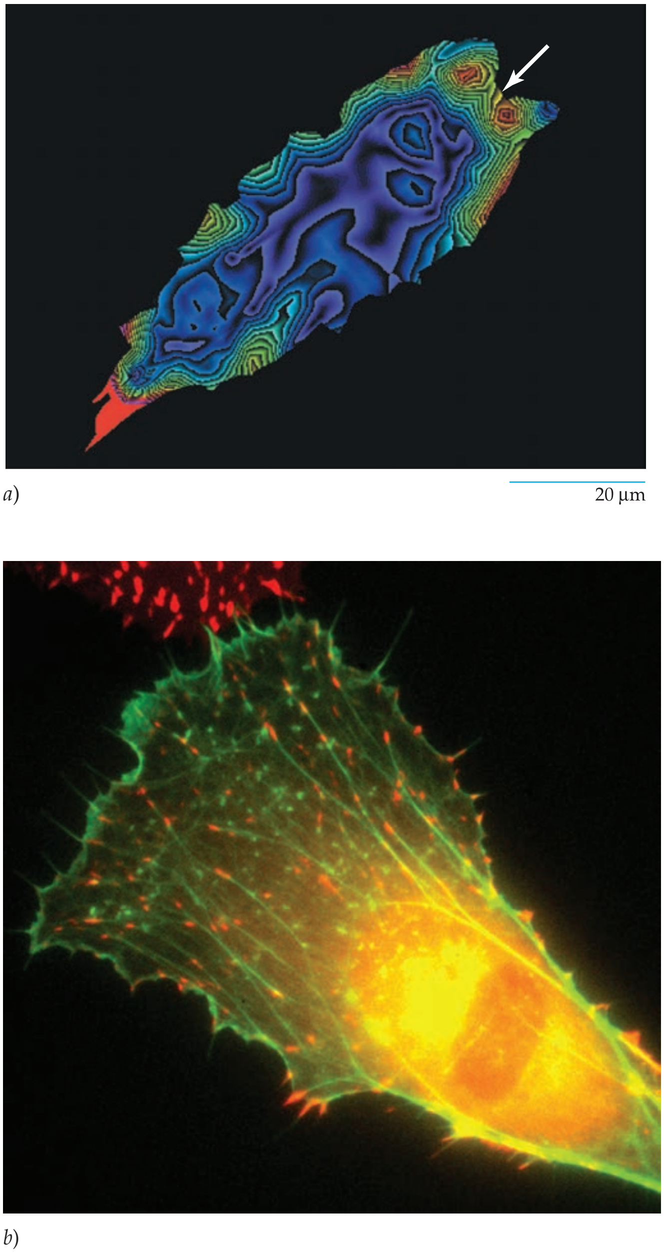



**FIGURA 9-64 Distribución de las fuerzas de tracción dentro de un fibroblasto migratorio.** *a*) Cuando una célula migra, genera fuerzas de tracción contra su sustrato. La presente imagen muestra las fuerzas de tracción generadas por unidad de área por la superficie de un fibroblasto migratorio. Las fuerzas de tracción se calcularon en diferentes sitios en la superficie en función del grado de deformación del sustrato (véase figura 7-17). La magnitud de las fuerzas de tracción se expresa mediante colores variados y el rojo representa las fuerzas más fuertes. Las fuerzas más grandes se generan en sitios de pequeños complejos focales que se forman transitoriamente detrás del borde de ataque de la celda donde se extiende el lamelipodio (flecha). La deformación en la parte posterior de la celda (que se muestra en rojo) se produce cuando el extremo delantero tira activamente de la cola, que está anclado pasivamente. *b*) Un fibroblasto vivo y migrante que presenta un lamelipodio bien desarrollado que se adhiere al sustrato subyacente en numerosos sitios (rojo). Esta célula expresa GFP-actina (verde) y ha sido inyectada con vinculina marcada con rodamina (rojo). La vinculina marcada fluorescentemente se incorpora en complejos focales tipo punto cerca del borde anterior de la célula. Algunos de estos complejos focales se desarman, mientras que otros maduran en adhesiones focales, que están situadas más lejos del borde que avanza.

FUENTE: *a*) Tomada de Karen A Beningo, Micah Dembo, y Yu-Li Wang. *J Cell Biol* 2001;153:885, fig. 3. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *b*) De J Victor Small, *et al*. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2002;3:957. Imagen cortesía de Olga Krylyshkina © 2002, reimpresa con permiso de Macmillan Publishers, Ltd.

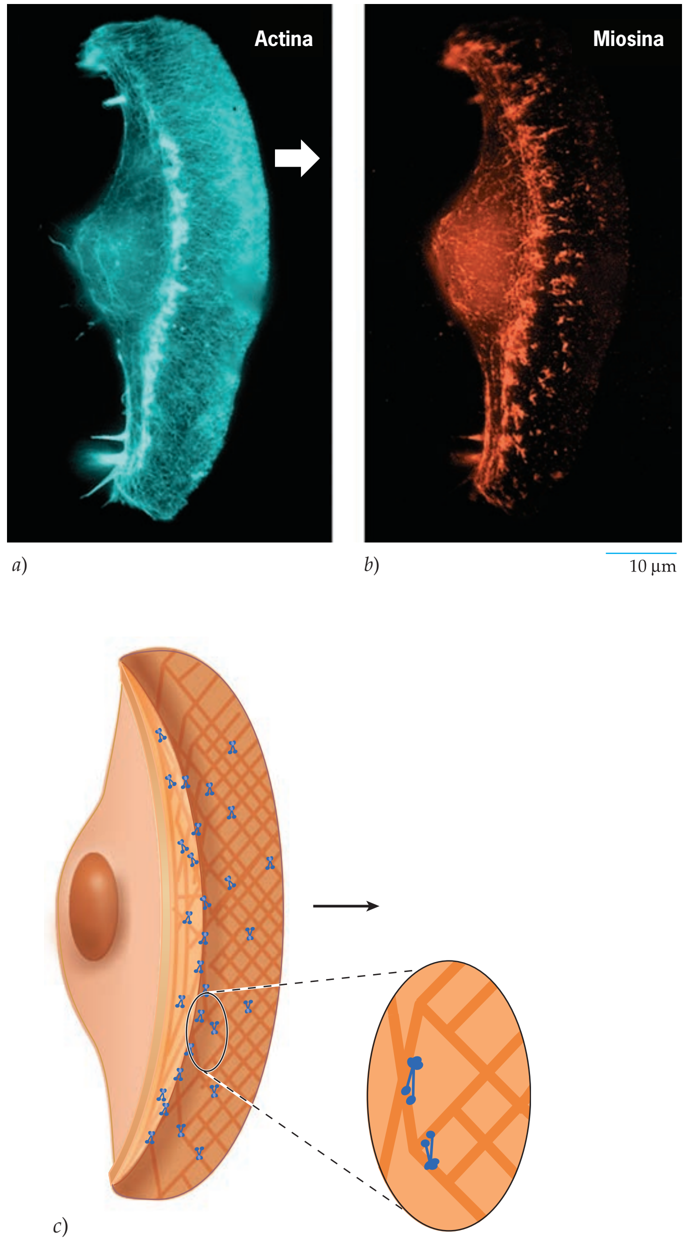



**FIGURA 9-65 Las funciones de actina y miosina en el movimiento lamelipodial de queratocitos de peces.** (*a,b*) Micrografías de fluorescencia de un queratocito de pez moviéndose sobre un plato de cultivo por medio de un lamelipodio ancho y aplanado. La flecha muestra la dirección del movimiento, que puede ocurrir a velocidades de 10 µm/min. La distribución de la actina filamentosa se revela en la parte *a*, que muestra la localización de la faloidina marcada fluorescentemente, que se une solo a los filamentos de actina. La distribución de miosina en la misma célula se revela en la parte *b*, que muestra la localización de anticuerpos fluorescentes antimiosina. Es evidente que el cuerpo del lamelipodio contiene filamentos de actina, pero está prácticamente desprovisto de miosina. La miosina se concentra, en cambio, en una banda que se encuentra justo detrás del lamelipodio, donde se fusiona con el cuerpo de la célula. c) Un dibujo esquemático que representa la red de actina filamentosa del lamelipodio y las interacciones actina-miosina hacia la parte posterior del lamelipodio. La red de actina se muestra en rojo, las moléculas de miosina en azul.

FUENTE: *a*) Por Alexander B Verkhovsky, tomada de Tatyana M Svitkina, *et al. J Cell Biol* 1977;139:397, fig. 1. Reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

trastantes de actina y miosina están bien ilustrados en estudios sobre queratocitos de peces, que son células derivadas de la epidermis que cubre las escamas de los peces. Los queratocitos han sido un sistema predilecto para estudiar la locomoción debido a que su rápido movimiento de deslizamiento depende de la formación de un lamelipodio muy ancho y delgado. La **FIGURA 9-65** muestra un queratocito en movimiento que se ha fijado y teñido para actina (figura 9-65*a*) y miosina II (figura 9-65*b*).

Como se esperaba de la discusión anterior, el borde de avance del lamelipodio se llena con actina. La miosina, por otro lado, se concentra en una banda donde la parte posterior del lamelipodio se une al resto de la célula. Las micrografías de esta región muestran la presencia de grupos de pequeños filamentos bipolares de miosina II unidos a la red de actina (figura 9-65*c*). Se presume que las fuerzas contráctiles generadas por estas moléculas de miosina arrastran la mayor parte de la célula detrás del lamelipodio que avanza. La miosina I y otras miosinas no convencionales también se cree que generan fuerzas para la locomoción celular en algunos organismos.

**REPASO**

1. Describa los pasos tomados por una célula de mamífero que se arrastra sobre un sustrato.



# 9.15 VÍA EXPERIMENTAL

## El estudio de la motilidad basada en actina fuera de las células

El borde de ataque de una célula móvil es un compartimiento complejo, atestado y dinámico, lleno de una multitud de diferentes tipos de proteínas. Analizar los roles de cada una de estas proteínas es de gran interés para los biólogos celulares, pero difícil de lograr dentro del contexto de una célula viviente. Es por esta razón que durante muchos años, la investigación se ha centrado en un sistema simplificado para la movilidad celular: movimiento intracelular de la bacteria grampositiva *Listeria monocytogenes*. El descubrimiento y el refinamiento de este sistema modelo ha sido una herramienta experimental importante que ha aumentado en gran medida nuestra comprensión de cómo las redes de actina se utilizan para generar fuerza *in vivo*.

La infección por *Listeria monocytogenes* fue descrita por primera vez en un informe en 1926 por E.G.D. Murray y sus colegas, que estaban estudiando la causa de una epidemia observada en conejos y conejillos de Indias.[1] La listeriosis se observó más tarde en humanos, pero no fue hasta comienzos de la década de 1980 que se relacionó con la ingestión de productos alimenticios contaminados. Las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por *Listeria* a veces pueden ser graves, particularmente en individuos inmunocomprometidos, pero con mayor frecuencia causa fiebre y síntomas gastrointestinales en adultos sanos.

La investigación sobre la causa de la listeriosis comenzó en serio a mediados de la década de 1980, llevando a múltiples laboratorios a descubrir que *Listeria* podía entrar y multiplicarse dentro del citosol de las células. Curiosamente, algunos investigadores, como Ed Havell en el Instituto Trudeau y Daniel Portnoy en la Universidad de Washington, observaron que la infección podría propagarse de una célula a sus células vecinas en una placa de Petri incluso en presencia de antibiótico extracelular, lo que sugiere que las bacterias eran de alguna manera capaz de infectar nuevas células directamente desde su célula huésped anterior.[2-3] Portnoy sospechó que el modo de infección podría estar basado en actina a partir de sus observaciones y que la adición de citocalasina, un inhibidor de la polimerización de la actina, podría impedir que la bacteria se propague a nuevas células. Para tener una mejor idea de lo que *Listeria* estaba haciendo en el citosol celular, Portnoy, luego en la Universidad de Pennsylvania, comenzó una colaboración con Lew Tilney, un prominente microscopista de electrones. Utilizando una línea celular similar a los macrófagos, Portnoy infectó un conjunto de placas de Petri con *Listeria* de tipo salvaje y, como control negativo, infectó otro conjunto con *Listeria* mutante que no pudo ingresar a las células. En puntos temporales específicos, las células se fijaron y se prepararon para microscopía electrónica. Dos horas después de la infección, Portnoy y Tilney observaron que *Listeria* nativa del citoplasma estaba rodeada por una nube de actina, que se confirmó mediante la decoración de los filamentos con fragmentos de miosina S1. En el intervalo de cuatro horas, se observaron numerosas bacterias con largas "colas" de filamentos de actina cortos orientados aleatoriamente que parecían haberse extendido desde un polo de *Listeria*, dándoles una apariencia de cometa (**FIGURA 1*b***). En los bordes de las células infectadas, aparecía algo de *Listeria* que empujaba protuberancias similares a dedos hacia fuera de la membrana celular. Basándose en estas instantáneas, Portnoy y Tilney postularon en 1989 que las colas del cometa de actina se usaban para impulsar *Listeria* a través del citoplasma, y finalmente se usaron para obtener acceso a una nueva célula huésped.

La descripción de las colas del cometa detrás de *Listeria* intrigó a los biólogos celulares que estudiaban el citoesqueleto de actina. Julie Theriot, una estudiante de posgrado en el laboratorio de Tim Mitchison en la Universidad de California, San Francisco, vio paralelismos entre sus estudios de la dinámica del filamento de actina en células de locomoción y la propulsión postulada de células de *Listeria* en el citosol. Durante el curso de sus estudios de posgrado, Theriot describió, por primera vez, la dinámica de las redes de actina en células de locomoción vivas usando actina marcada fluorescentemente y un sistema de videomicroscopía casera. Para seguir una población específica de monómeros de actina a lo largo del tiempo, Theriot acopló un compuesto fluorescente fotoactivable a los monómeros de actina e inyectó la actina marcada en las células vivas. Luego permitió que la actina marcada se incorporara a los polímeros de actina en la célula. Al iluminar una longitud de onda específica en una pequeña región rectangular del lamelipodio, Theriot podría activar la fluorescencia de la actina marcada y observar cómo se comportó la actina filamentosa marcada en las células móviles (**FIGURA 1*a***). Al activar una región en la parte frontal del lamelipodio, observó que los filamentos de actina marcados permanecían organizados y estacionarios con respecto al sustrato a medida que la célula avanzaba. Este fue el caso de todas las celdas de rastreo que observó, sin importar qué tan rápido se movieran a través del sustrato. La barra de fluorescencia finalmente se dispersó y desapareció cuando la barra se acercó a la parte posterior de la celda, lo que sugiere que los filamentos finalmente se desmantelaron por completo y los monómeros se reciclaron. A partir de estas observaciones, Theriot y Mitchison propusieron que la extensión del lamelipodio durante la motilidad celular fue causada por la polimerización de nuevos filamentos de actina en el borde de ataque (en lugar de la redisposición de los filamentos existentes).

En colaboración con Portnoy y Tilney, Theriot y Mitchison utilizaron el sistema experimental que desarrollaron para estudiar el movimiento de *Listeria*. En este caso, Theriot inyectó monó-

## 14.8 Prometafase

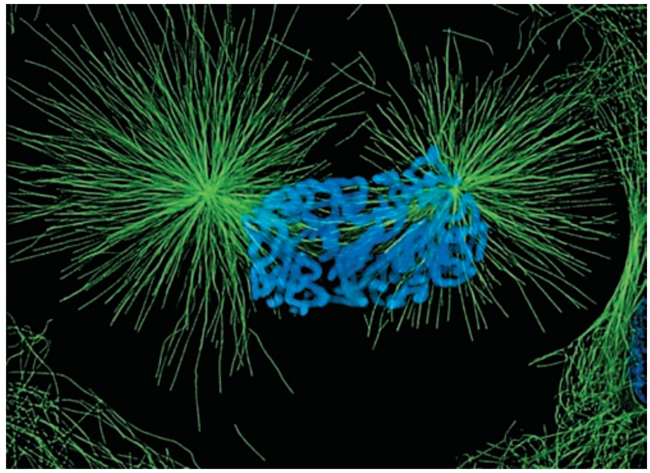
La disolución de la envoltura nuclear marca el inicio de la segunda fase de la mitosis, la **prometafase**, durante la cual se completa el ensamblaje del huso mitótico, y los cromosomas se mueven a su posición en el centro de la célula. La siguiente discusión proporciona una imagen generalizada de los pasos de la prometafase; se han reportado muchas variaciones en estos eventos.

Al comienzo de la prometafase los cromosomas compactados se dispersan por el espacio que era la región nuclear (**FIGURA 14-20*a***). A medida que los microtúbulos del huso penetran en la región central de la célula, los extremos libres (+) de los microtúbulos se ven crecer y contraerse de forma dinámica, como si estuvieran "buscando" un cromosoma. No es seguro si la búsqueda es completamente aleatoria, ya que la evidencia sugiere que los microtúbulos pueden crecer preferentemente hacia un sitio que contiene cromatina. Esos microtúbulos que entran en contacto con un cinetocoro son "capturados" y estabilizados.

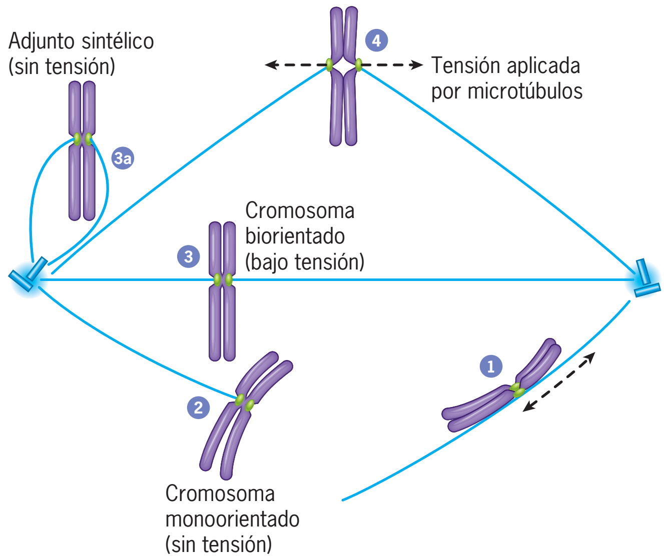
Un cinetocoro por lo general hace contacto inicial con la pared lateral de un microtúbulo en lugar de con su extremo (paso 1, figura 14-20*b*). Una vez que se produce el contacto inicial, algunos cromosomas se mueven activamente a lo largo de la pared del microtúbulo, impulsados por proteínas motoras ubicadas en el cinetocoro. Sin embargo, pronto el cinetocoro tiende a asociarse de manera estable con el extremo (+) de uno o más microtúbulos del huso de uno de sus polos (paso 2). Un cromosoma que se une a los microtúbulos de un solo polo del huso representa una etapa intermedia inestable en el curso de la prometafase. Eventualmente, el cinetocoro sin unir en la cromátida hermana captura sus propios microtúbulos del polo opuesto del huso (paso 3).

La evidencia reciente ha demostrado que los microtúbulos también pueden ser nucleados a través de una vía basada en la cromatina. Estos microtúbulos crecen desde el cromosoma mediante la incorporación de subunidades de tubulina proximales a la cromatina, y una vez ensamblados se incorporan al huso mitótico. La nucleación de microtúbulos a partir de sus lados también se ha observado recientemente. Todos estos mecanismos contribuyen a la alta densidad de microtúbulos dentro del huso, lo que ayuda a asegurar que las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma mitótico finalmente se conecten por sus cinetocoros a los microtúbulos que se extienden desde los polos opuestos. Las observaciones en las células vivas indican que los cromosomas prometafase asociados con los microtúbulos del huso no se mueven directamente al centro del huso, sino más bien oscilan adelante y atrás tanto en la dirección polo como en la antipolo. En última instancia, los cromosomas de una célula de prometafase se mueven mediante un proceso denominado **congresión** hacia el centro del huso mitótico, a medio camino entre los polos (paso 4, figura 14-20*b*). Las fuerzas requeridas para los movimientos cromosómicos durante la prometafase son generadas por las proteínas motoras asociadas con ambos; los cinetocoros y los brazos de los cromosomas [representados en la figura 14-33*a*) y discutidos en la sección anterior]. La **FIGURA 14-21** muestra las consecuencias de una deficiencia de la proteína motora acromosómica, cuya actividad empuja al cromosoma lejos de los polos.

La dinámica de los microtúbulos también realiza un papel clave para facilitar los movimientos cromosómicos durante la prometafase. A medida que los cromosomas convergen hacia el centro del huso mitótico, se acortan los microtúbulos más largos unidos a un cinetocoro, mientras que los microtúbulos más cortos unidos al cinetocoro hermano se alargan. Se cree que estos cambios en la longitud de los microtúbulos se rigen por diferencias en la fuerza de tracción (tensión) en los dos cinetocoros hermanos.



*a*)




*b*)

**FIGURA 14-20 Prometafase** *a*) Microfotografía de fluorescencia de una célula cultivada de pulmón del anfibio newt en la etapa de prometafase temprana de la mitosis, justo después de que se ha roto la envoltura nuclear. Los microtúbulos del huso mitótico ahora pueden interactuar con los cromosomas. El huso mitótico aparece en verde después del marcaje con un anticuerpo monoclonal contra la tubulina, mientras que los cromosomas aparecen en azul después del marcaje con un tinte fluorescente. *b*) Vista esquemática de algunas de las etapas sucesivas de las interacciones entre microtúbulos de los cromosomas durante la prometafase. En el paso 1, un cinetocoro ha hecho contacto con la pared lateral de un microtúbulo y es capaz de utilizar motores unidos a cinetocoros para deslizarse en cualquier dirección a lo largo del microtúbulo. En el paso 2, un cromosoma se ha unido al extremo + de un microtúbulo de un polo del huso (una adición sobrefinal que forma un cromosoma monoorientado). En el paso 3, el cromosoma se ha adjuntado en una orientación sobrefinal de los microtúbulos de ambos polos (formando un cromosoma bioorientado). En el paso 4, el cromosoma biorientado se ha movido al centro de la célula y se convertirá en parte de la placa metafásica. Los cromosomas en esta etapa están bajo tensión (como lo indica el espacio entre las cromátidas) debido a las fuerzas de tracción contrarias, ejercidas por los microtúbulos de los polos opuestos. El cromosoma en el paso 3a tiene ambos cinetocoros unidos a microtúbulos del mismo polo del huso. Esta conexión sintélica anormal se trata en la página 566.

FUENTE: *a*) Cortesía de Alexey Khodjakov, Wadsworth Center, NY.

ejemplo, se demostró que la profilina de unión al monómero de actina, que se conocía bioquímicamente para potenciar la polimerización de actina, aumentaba la velocidad de movimiento de dos a tres veces. Algunos hallazgos fueron más inesperados, como el efecto de la proteína VASP, cuya ausencia causó una disminución diez veces mayor en la tasa de movimiento.

En otros laboratorios, los investigadores experimentaron con la sustitución de la bacteria *Listeria* en sus medios de motilidad con "carga" artificial. Esto les permitió probar el impacto de cambiar el tamaño y la forma de la carga, así como la concentración de ActA en la superficie. Lisa Cameron y sus colegas en el laboratorio de Julie Theriot en la Universidad de Stanford recubrieron cuentas de plástico pequeñas con proteína ActA purificada y las observaron después de colocarlas en extracto citoplásmico.[11] Observaron que las cuentas de menos de 0.5 µm formaban nubes de actina y luego colas de cometas en 1 hora de incubación y se movían a velocidades comparables a las células de *Listeria*. Las cuentas de más de 0.5 µm, sin embargo, formaron nubes simétricas de actina polimerizada, pero permanecieron inmóviles en gran medida. Descubrieron que la motilidad podría ser rescatada en las cuentas más grandes al recubrir solo la mitad del cordón con ActA. Estos resultados, junto con los de otros laboratorios que estudian la motilidad basada en cuentas, llevaron a numerosos estudios biofísicos y computacionales explorando los parámetros moleculares y parámetros físicos que permiten que cuentas de *Listeria* o similares a *Listeria* "rompan la simetría", es decir, escapen de la nube de actina simétrica que inicialmente generan y se impulsen en una dirección específica.

La relativa simplicidad del sistema de motilidad basado en *Listeria*, con su lista de componentes bien definidos y relativamente bien entendidos, atrajo a biólogos computacionales que buscaban crear modelos computacionales de motilidad. Jonathan Alberts y Garrett Odell, de la Universidad de Washington en Friday Harbor, recapitularon con éxito muchas de las propiedades dinámicas observadas de la motilidad basada en *Listeria* usando una simulación que denominaron un experimento de "reconstitución *in silico*" en 2004 (**FIGURA 2**).[12] La simulación que diseñaron se basó en parámetros bien conocidos y observados experimentalmente, como las tasas de asociación y disociación de proteínas y las tasas de actina ATPasa, y describieron las interacciones bioquímicas y mecánicas que implican cientos de filamentos de actina. Satisfactoriamente, la velocidad y la dinámica general de *Listeria in silico* fue consistente con los observados *in vivo* y en los vitromodelos. La simulación también reveló movimiento saltatorio, donde la bacteria simulada se detiene antes de continuar a lo largo de su trayectoria, una observación que también se hizo para el movimiento bacteriano usando *Listeria* en vivo. Esta simulación, y otros experimentos inherentes realizados por otros grupos, han servido para probar, confirmar y mejorar nuestra comprensión de la motilidad basada en actina.



**FIGURA 2 Imagen fija de una simulación computacional de la motilidad basada en actina de una bacteria *Listeria*.** Los *filamentos* de actina simulados aparecen como líneas amarillas detrás de la bacteria (contorno blanco).

FUENTE: Jonathan B. Alberts, Garret M. Odell. *PLOS Biology* 2004;2(12). Cortesía de Jonathan B Alberts.

## Referencias


1. Murray, E. G. D., Webb, R. Swann, H. B. R. A. disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol* 1926;29:407-439.
2. Havell E. A. Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes. Infect Immun* 1986;54:787-792.
3. Tilney L. G., Portnoy D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes. J Cell Biol* 1989;109:1597-1608.
4. Theriot J. A., Mitchison T. J. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 1991;352:126-131.
5. Theriot J. A., Mitchison TJ, Tilney LG, Portnoy DA. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 1992;357:257-260.
6. Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P. L. *monocytogenes-induced* actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 1992;68:521-531.
7. Domann E., Wehland J., Rohde M., Pistor S., Hartl M., Goebel W, Leimeister-Wächter M., Wuenscher M., Chakraborty T. A. novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 1992 May;11(5):1981-90.
8. Kocks C., Marchand J. B., Gouin E., d' Hauteville H., Sansonetti P. J., Carlier MF, Cossart P. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria* innocua and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol* 1995 Nov;18(3):413-23.
9. Welch M. D., Iwamatsu A., Mitchison T. J. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes. Nature* 1997 Jan 16;385(6613):265-269.
10. Loisel T. P., Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 1999 Oct 7;401(6753):613-6.
11. Cameron L. A., Footer M. J., van Oudenaarden A., Theriot J. A. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Apr 27;96(9): 4908-4913.
12. Alberts J. B., Odell G. M. *In silico* reconstitution of *Listeria* propulsion exhibits nano-saltation. *PLoS Biol* 2004 Dec;2(12):e412. Epub 2004 Nov 30.

## 9.16 Procesos dependientes de actina durante el desarrollo

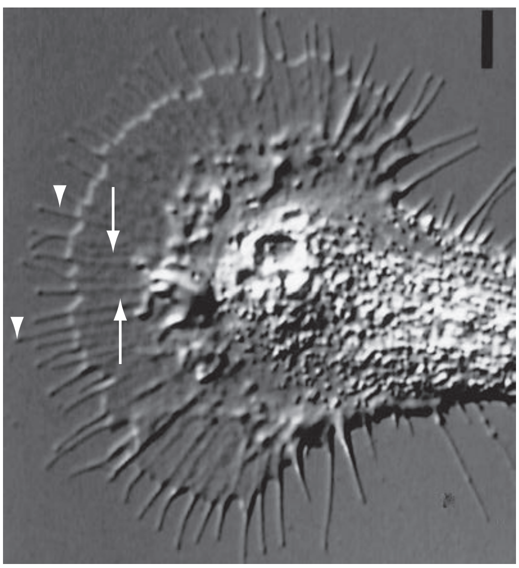
Durante el desarrollo de un organismo multicelular, el citoesqueleto de actina impulsa a las células a través de una serie de procesos esenciales. Discutiremos dos temas, el crecimiento axonal y los cambios de forma celular durante el desarrollo, a continuación.

### Crecimiento axonal

En 1907 Ross Harrison de la Universidad de Yale realizó uno de los experimentos clásicos en biología. Harrison extrajo una pequeña porción de tejido del sistema nervioso en desarrollo de un embrión de rana y colocó el fragmento en una pequeña gota de líquido linfático. Harrison observó el tejido bajo el microscopio durante los días siguientes y descubrió que las células nerviosas no solo se mantenían sanas, sino que muchas de ellas brotaban procesos que crecían en el medio circundante. No solo fue esta la primera vez que las células se mantuvieron vivas en el cultivo de tejidos, sino que el experimento también proporcionó una fuerte evidencia de que los axones se desarrollan mediante un proceso de crecimiento y alargamiento activo.

La punta de un axón alargado es muy diferente del resto de la célula (véase figura 9-1*b*). Aunque la mayor parte del axón muestra poca evidencia externa de actividad móvil, la punta o **cono de crecimiento** se asemeja a un fibroblasto muy móvil y rastrero. El examen minucioso de un cono de crecimiento vivo revela varios tipos de protuberancias locomotrices: un lamelipodio ancho y aplanado que se arrastra hacia afuera sobre el sustrato; micropinchos cortos y rígidos (**FIGURA 9-66*a***) que apuntan hacia el borde del lamelipodio; y filopodios muy alargados que se extienden y se retraen en una exhibición continua de actividad móvil. La microscopía de fluorescencia muestra que todas estas estructuras en el dominio periférico del cono de crecimiento se rellenan con filamentos de actina (se muestran en verde, figura 9-66*b*). Se supone que estos filamentos de actina son responsables de las actividades móviles del cono de crecimiento. Los microtúbulos, por otro lado, llenan el axón y el dominio central del cono de crecimiento, proporcionando soporte para el axón delgado y alargado. Se ve una cantidad de microtúbulos individuales que penetran en la periferia rica en actina (se muestra en naranja, figura 9-66*b*). Estos microtúbulos penetrantes son altamente dinámicos y se cree que juegan un papel importante en dirigir el cono de crecimiento en la dirección apropiada.

El cono de crecimiento es una región altamente móvil de la célula que explora su entorno y alarga el axón. Dentro del embrión, los axones de las neuronas en desarrollo crecen a lo largo de trayectorias definidas, siguiendo ciertas características topográficas del sustrato o respondiendo a la presencia de ciertas sustancias químicas que se difunden en su camino. El lamelipodio y los filopodios del cono de crecimiento responden a la presencia de estos estímulos físicos y químicos, lo que hace que los axones que los dirigen se vuelvan hacia factores atractivos y se alejen de los factores repulsivos. La **FIGURA 9-67*a*)** muestra cómo una neurona cultivada cuya punta de avance ha dado un giro directo hacia una proteína difusible llamada netrina, que actúa como un atrayente para los axones que crecen dentro del embrión temprano. La figura 9-67*b* muestra un cono de crecimiento (verde) que establece contacto con una célula que expresa otra proteína llamada efrina (rojo) que también actúa como un factor de orientación neuronal. A diferencia de la netrina, la efrina es una proteína integral no difusible de la membrana plasmática que se une a un receptor de efrina en la superficie del cono de crecimiento. El cono de crecimiento está en contacto con la célula que expresa efrina por medio de sus filopodios largos, que cumplen una función sensorial. En última instancia, el cableado correcto de todo el sistema nervioso depende de la extraña habilidad de los conos de crecimiento embrionario para tomar las "decisiones" de dirección adecuadas que los conducen al órgano blanco que deben inervar.


*a*)

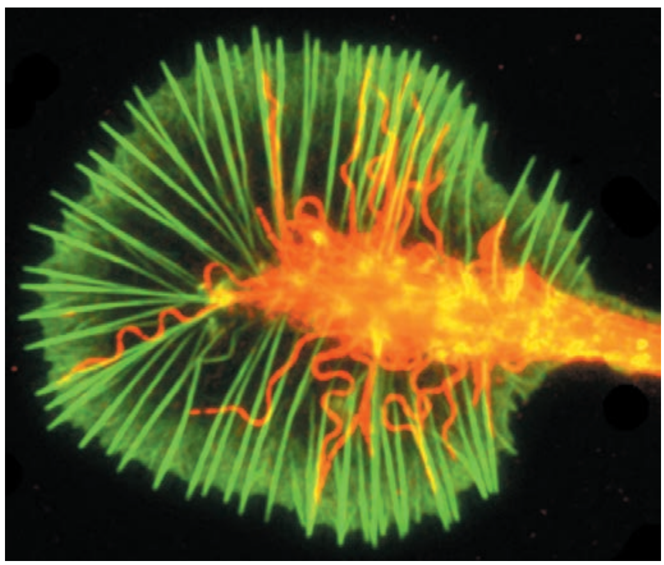

*b*)

**FIGURA 9-66** La estructura de un cono de crecimiento: la punta móvil de un axón en crecimiento. *a*) Una imagen de video de un cono de crecimiento vivo. El término se extiende en un lamelipodio aplanado que se arrastra hacia adelante sobre el sustrato. Se pueden ver microspikes en forma de varillas (flechas) dentro del velo transparente del lamelipodio, y se pueden ver procesos finos llamados filopodios (puntas de flecha) que se proyectan por delante del borde anterior del lamelipodio. Bar, 5 µm. *b*) Microfotografía de fluorescencia del cono de crecimiento de un euron que muestra los filamentos de actina (verde) concentrados en el dominio periférico y los microtúbulos (naranja) concentrados en el dominio central. Se puede ver que varios microtúbulos invaden el dominio periférico, donde interactúan con haces de filamentos de actina.

FUENTE: *a*) Tomada de Paul Forscher y Stephen J Smith. *J Cell Biol* 1988;107:1508, fig. 2. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *b*) de Feng-Quan Zhou, Clare M Waterman-Storer, y Christopher S Cohan. *J Cell Biol* 2002;(157):5, portada. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

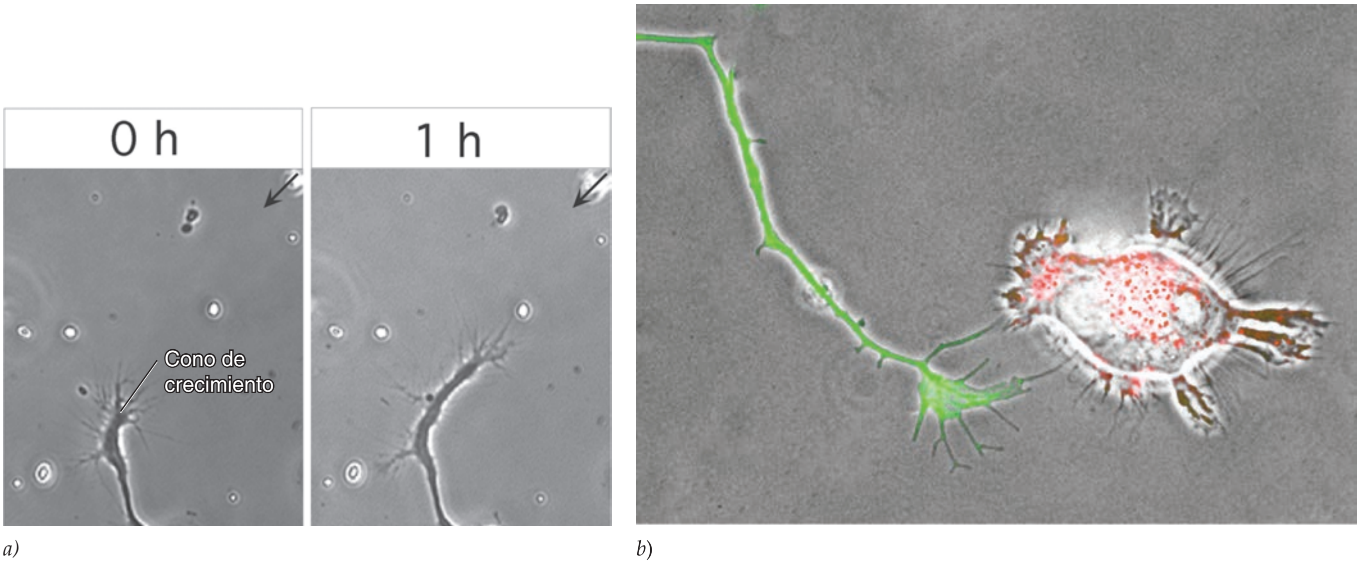



**FIGURA 9-67 Los movimientos dirigidos de un cono de crecimiento.** *a*) Una imagen de video de un cono de crecimiento vivo de *Xenopus neuron* que se ha vuelto hacia una proteína difusible (netrin-1) liberada de una pipeta cuya posición está indicada por la flecha. *b*) El cono de crecimiento (verde) en la punta de un axón motor ha hecho contacto por medio de sus filopodios con una célula blanco que expresa el factor de guía neuronal de la efrina (rojo).

FUENTE: *a*) Tomada de Elke Stein y Marc Tessier-Lavigne. *Science* 2001;291:1929. Reimpresa con permiso de AAAS; *b*) Cortesía de Irina Dudanova.

**CAMBIOS EN LA FORMA DE LA CÉLULA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.** Cada parte del cuerpo tiene una forma característica y una arquitectura interna que surge durante el desarrollo embrionario: la médula espinal es básicamente un tubo hueco, el riñón está formado por túbulos microscópicos, cada pulmón está compuesto de espacios aéreos microscópicos, y así sucesivamente. Numerosas actividades celulares son necesarias para el desarrollo de la morfología característica de un órgano, incluidos los cambios programados en la forma de la célula. Estos cambios se producen principalmente por variaciones en la orientación de los elementos del citoesqueleto dentro de las células. Uno de los mejores ejemplos de este fenómeno se ve en las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso.

Hacia el final de la gastrulación en los vertebrados, las células externas (ectodérmicas) situadas a lo largo de la superficie dorsal del embrión se alargan y forman una capa epitelial alta llamada placa neural (**FIGURA 9-68*a,b***). Las células de la placa neural se alargan a medida que los microtúbulos se orientan con sus ejes largos paralelos al de la célula (recuadro, figura 9-68*b*). Después del alargamiento, las células del epitelio neural se estrechan en un extremo, lo que hace que se conviertan en cuña y toda la capa de células se curve hacia adentro (figura 9-68*c*). Este último cambio en la forma de la célula se produce por la contracción de una banda de microfilamentos que se ensamblan en la región cortical de las células justo debajo de la membrana celular apical (recuadro, figura 9-68*c*). Eventualmente, la curvatura del tubo neural hace que los bordes exteriores entren en contacto, formando un tubo hueco cilíndrico (figura 9-68*d,e*) que dará lugar al sistema nervioso completo del animal.

**REPASO**

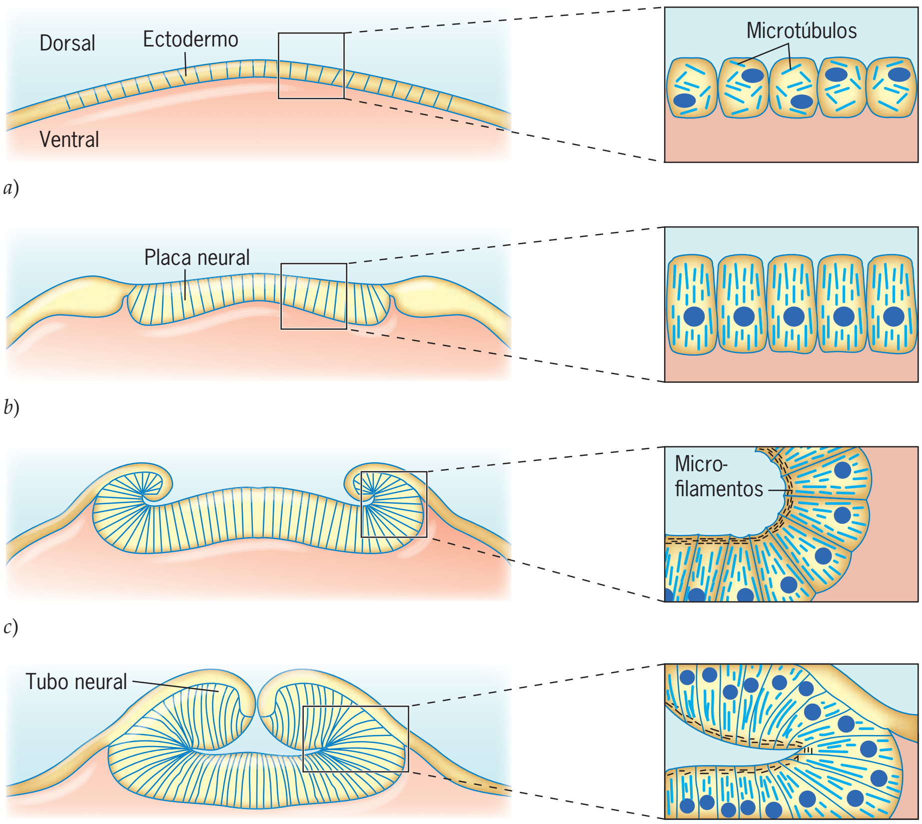
1. Describa el papel de los filamentos de actina en las actividades del cono de crecimiento de una neurona.

## 9.17 El citoesqueleto bacteriano

Durante muchos años, se sostuvo que el citoesqueleto era estrictamente una innovación eucariótica que estaba ausente de las células procariotas. Investigaciones recientes de la última década han revelado que numerosos procariotas contienen tubulina, actina y proteínas similares a filamentos intermedios. Se ha encontrado que muchas de estas proteínas bacterianas están relacionadas estructural y funcionalmente con proteínas citoesqueléticas eucariotas, lo que sugiere que la actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios han evolucionado a partir de estructuras procarióticas (**FIGURA 9-69**).

El citoesqueleto bacteriano debe llevar a cabo muchas de las mismas tareas que el citoesqueleto eucariota, aunque a menor escala. Por ejemplo, la función de construir el anillo citocinético durante la división celular se lleva a cabo mediante actina en eucariotas, y por la proteína FtsZ en procariotas. La FtsZ se polimeriza en numerosos filamentos cortos tipo varilla en el sitio de la división celular, generando un anillo contráctil generador de fuerza y tirando de la membrana hacia adentro para llevar a cabo la fisión celular (figura 9-69*c*). Aunque actúa de forma análoga al citoesqueleto de actina durante la citoquinesis, la FtsZ es en realidad un homólogo de tubulina que se encuentra en casi todas las células procariotas.

Se ha demostrado que otra proteína citoesquelética procariota, ParM, desempeña un papel en la segregación de los plásmidos, análoga a la acción de los microtúbulos durante la mitosis [**FIGURAS** 9-69*a*), **9-70**]. Durante la división celular, los filamentos de ParM se unen indirectamente a regiones específicas de tipo centrómero de plásmidos de bajo número de copias y los empujan a polos opuestos de la célula a través de un mecanismo de polimerización bidireccional. El resultado es que cada célula hija recibe una copia del plásmido, un resultado que sería muy improbable sin un sistema de segregación de este tipo. Curiosamente, los estudios bioquímicos de ParM han revelado que experimenta ciclos de crecimiento y desensamblaje rápidos, muy similares a la inestabilidad dinámica que se observa en los microtúbulos. La

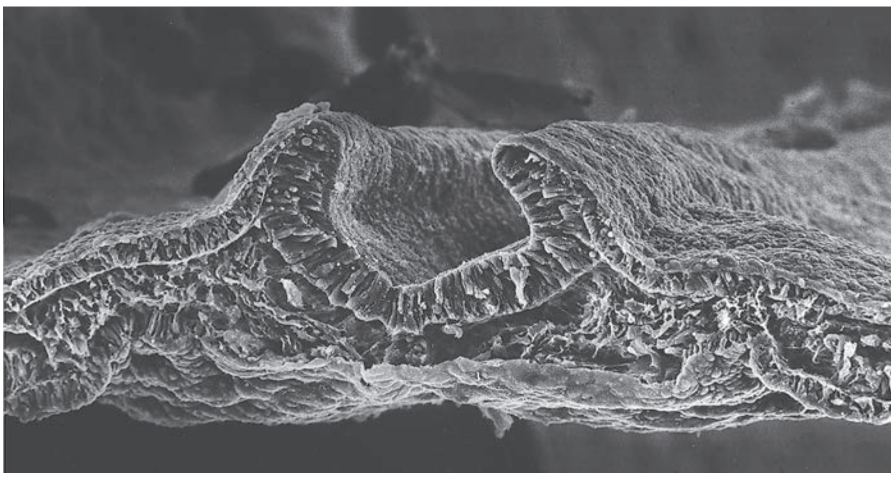



*a*)

*b*)

*c*)

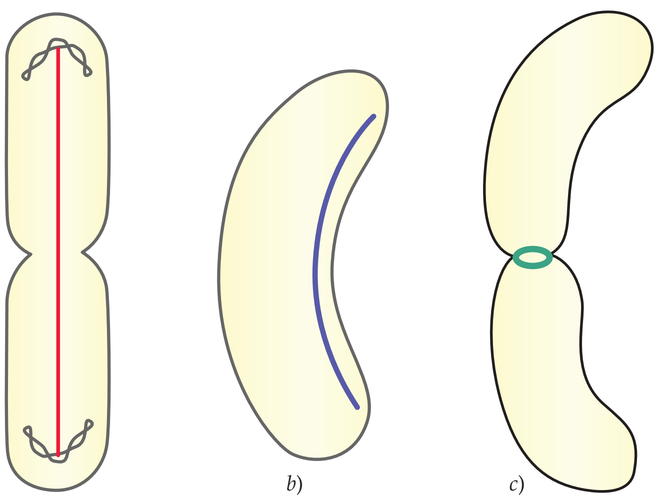
*d*)



*e*)

**FIGURA 9-68 Primeras etapas en el desarrollo del sistema nervioso vertebrado.** (*a-d*) Dibujos esquemáticos de los cambios en la forma de la célula que provocan que una capa de células ectodérmicas aplanadas en la región medio-dorsal del embrión se enrolle en un tubo neural. Se cree que el cambio inicial en la altura de las células es impulsado por la orientación y elongación de los microtúbulos, mientras que el balanceo de la placa en un tubo se cree que es impulsado por fuerzas contráctiles generadas por filamentos de actina en los extremos apicales de las células. *e*) Micrografía electrónica de barrido de la superficie dorsal de un embrión de pollo a medida que su placa neural se pliega para formar un tubo.

FUENTE: *e*) Cortesía de Kathryn W Tosney.



*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 9-69 Los filamentos del citoesqueleto bacteriano llevan a cabo funciones similares a sus homólogos eucariotas.** *a*) ParM se polimeriza en filamentos que separan dos plásmidos hermanos, de forma análoga a la función de los microtúbulos. *b*) Paralelamente al papel de los filamentos intermedios, CreS polimeriza proximalmente a la membrana y juega un papel clave en la forma de la célula. *c*) Al igual que la actina durante la citoquinesis, los polímeros FtsZ forman un anillo contráctil que ayuda a separar las dos células hijas.

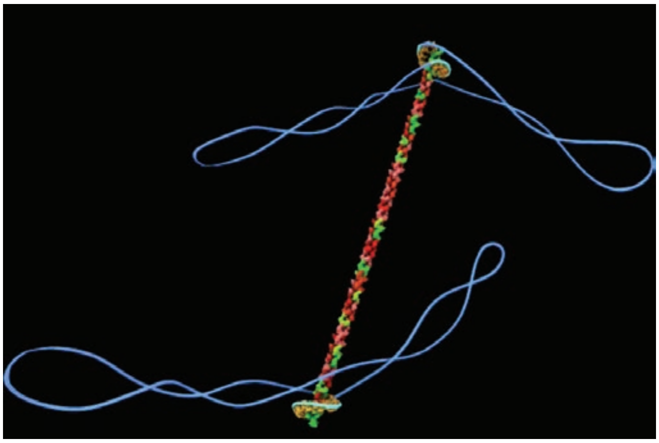


**FIGURA 9-70** ParM segrega plásmidos de bajo número de copias. Imagen fija de una animación que demuestra cómo la proteína ParM, parecida a la actina, puede separar dos plásmidos hermanos durante la división celular.

interacción con el plásmido estabiliza los extremos de los filamentos de ParM, lo que les permite seguir creciendo, de forma muy similar a como las proteínas de unión + TIP pueden estabilizar los microtúbulos. Pero a pesar de estas similitudes con los microtúbulos, ParM es estructuralmente similar a la actina, más que a la tubulina.

Sin embargo, otras proteínas citoesqueléticas bacterianas han sido implicadas en la regulación de la forma de las células. Un ejemplo de esta clase de proteínas es la crescentina (CreS), una proteína intermedia tipo filamento que se encuentra en la bacteria en forma de media luna *Caulobacter crescentus*. Se ha descubierto que CreS forma filamentos agrupados en la porción cóncava altamente curvada de la membrana celular (figura 9-69*b*). La eliminación del gen creS provoca la pérdida de la curvatura de la celulitis, lo que hace que las células aparezcan como barras rectas en lugar de semilunas. Otro ejemplo de una proteína del citoesqueleto que controla la forma de la célula es el homólogo de tipo actina MreB, el cual se expresa en bacterias con forma de barra, como *Escherichia coli*, así como en bacterias helicoidales. La eliminación de los resultados de *mreB* en células esféricas, indica claramente su papel clave en la determinación de la forma. El mecanismo y la estructura de MreB *in vivo* actualmente no está claro, pero es un área de investigación activa.

**REPASO**

1. ¿Cómo son las proteínas citoesqueléticas bacterianas similares a sus contrapartes de mamíferos? ¿En qué se diferencian?

# Preguntas analíticas

1. Si se extrajo una miofibrilla para que los sarcómeros aumentaran en longitud en aproximadamente un 50%, ¿qué efecto esperaría que esto tenga sobre la capacidad contráctil de la miofibrilla? ¿Por qué? ¿Qué efectos tendría esto en las bandas H, A e I?
2. ¿Por qué los microtúbulos se desarman en los extremos en lugar de desmoronarse en el medio? Sugerencia: Considere las interacciones proteína-proteína que hace un dímero alfa-beta-tubulina cuando se ensambla en la red de microtúbulos.
3. ¿Cuáles son los dos tipos de motilidad celular que podrían no verse afectados si se agotaran tanto la miosina I como la miosina II? ¿Por qué?
4. Un centriolo contiene __________ microtúbulos completos, y un cilio contiene __________ microtúbulos completos.
5. Los microtúbulos se pueden formar *in vitro* a partir de tubulina que se une a análogos de GTP que (a diferencia de GTP) no se pueden hidrolizar. ¿Qué propiedades esperaría que tuvieran estos microtúbulos? ¿Podrían esos microtúbulos mostrar inestabilidad dinámica?
6. Enumere dos cosas que podría hacer que cambiarían el equilibrio dinámico de una preparación *in vitro* de tubulina y microtúbulos para la formación de microtúbulos. Enumere dos tratamientos que cambiarían el equilibrio en la dirección opuesta.
7. Se observó que un axonema ciliar o flagelar desmembrado es capaz de latir con una frecuencia y un patrón normales. ¿Puede concluirse que la membrana plasmática no es importante en la función ciliar o flagelar?
8. Debido a que las vesículas citoplásmicas se ven movidas en ambas direcciones dentro de un axón, ¿puede concluirse que algunos microtúbulos están orientados con su extremo más dirigido hacia el extremo del axón y otros orientados con la polaridad opuesta? ¿Por qué sí o por qué no?
9. ¿Estaría de acuerdo con la afirmación de que el centrosoma desempeña un papel clave en la determinación de las tasas de alargamiento y acortamiento de los microtúbulos de una célula animal? ¿Por qué sí o por qué no?
10. Si estuviera comparando la estructura molecular de la cinesina y la miosina, que se cree que se derivaron de una proteína ancestral común, ¿qué parte (cabezas o colas) esperaría que fuera más similar entre ellas? ¿Por qué?
11. La figura 9-25*a*) muestra la apariencia de una sección transversal de un corte de axonema ciliar en una porción interior del cilio. ¿Cómo podría diferir la imagen de una sección transversal si hubiera sido cortada muy cerca de la punta de un cilio al comienzo de la carrera de recuperación?
12. Si una molécula de cinesina individual puede moverse a una velocidad de 800 nm/s en un ensayo de motilidad *in vitro*, ¿cuál es la velocidad de rotación máxima (moléculas de ATP hidrolizadas por segundo) por uno de los dominios motores de la molécula? (Véase **"Video tutorial cuantitativo"**).
13. El rodaje de actina (figura 9-39) requiere que los monómeros de actina se disocien del extremo puntiagudo del filamento de actina, mientras que al mismo tiempo los monómeros de actina se están asociando en el extremo con púas del filamento. Si comenzamos con un filamento de actina y sacamos una subunidad de uno u otro extremo, en cualquier caso ahora tenemos una subunidad de actina libre más un filamento que es más corto en un monómero. Si el estado inicial es el mismo (filamento único de actina) y el estado final es el mismo (filamento más corto más un monómero), la diferencia de energía libre debe ser la misma y, como se muestra en el capítulo 3, la constante de disociación debe ser la misma. Entonces, ¿cómo es posible tener una concentración de actina que permita la disociación en un extremo y la asociación en el otro? ¿Qué actividad bioquímica de la actina tiene nuestra simple declaración del problema ignorado?
14. ¿Qué tipo de tejido vertebrado esperaría que fuera una excelente fuente de tubulina, de actina y de queratina? ¿Qué pro-

teína esperaría que fuera la menos soluble y la más difícil de extraer? ¿Qué tipos de proteínas esperaría como contaminantes en una preparación de tubulina? ¿Cuáles esperaría en una preparación de actina?

15. La actina es una de las proteínas conservadas evolutivamente. ¿Qué le dice esto sobre la estructura y función de esta proteína en células eucarióticas?
16. ¿Cómo es posible que las células vegetales superiores puedan operar sin dineína citoplásmica?
17. La acción de la miosina II (figura 9-53) difiere de la de la cinesina (figura 9-9) en que una de las cabezas de cinesina está siempre en contacto con un microtúbulo, mientras que ambas cabezas de miosina se desprenden por completo del filamento de actina. ¿Cómo se correlacionan estas diferencias con los dos tipos de actividades motoras en las que participan estas proteínas?
18. Se cree que los microtúbulos de un axón están nucleados en el centrosoma, luego se separaron de su sitio de nucleación y se trasladaron al axón. Se observó en el texto que la dineína citoplásmica es responsable del movimiento retrógrado de los organelos en los axones, aunque se cree que este mismo motor media el movimiento anterógrado de los microtúbulos en estos mismos procesos celulares. ¿Cómo es posible que el mismo motor negativo orientado a los extremos pueda estar involucrado tanto en movimientos anterógrados como retrógrados? Sugerencia: revise los ensayos de motilidad *in vitro* para proteínas motoras.
19. Las proteínas motoras a menudo se describen como mecanoenzimas. ¿Por qué? ¿Podría este mismo término aplicarse a prácticamente todas las enzimas? ¿Por qué sí o por qué no?
20. En eucariotas, la tubulina está involucrada en la segregación cromosómica mientras que la actina participa en la construcción del anillo contráctil que divide las células. Contraste los roles de tubulina y homólogos de actina en bacterias con sus funciones en eucariotas.
21. La cinesina mide 8 nm por ATP hidrolizado, y sin ATP no puede pasar. A medida que aumenta la concentración de ATP, la cinesina se mueve con más frecuencia y se mueve más rápido. ¿Se puede hacer que la cinesina se mueva infinitamente rápido si se agrega suficiente ATP?

CAPÍTULO

# 10 La naturaleza del gen y el genoma



FUENTE: Cortesía de Leah Fasten Photography

## LA GENÓMICA DEVIENE PERSONAL

En el invierno de 2003, nació una niña que se convirtió en un símbolo para el campo emergente de la genómica personalizada. Bea Rienhoff era, básicamente, una bebé sana, pero mostró una constelación de rasgos inusuales, que incluyeron ojos ampliamente separados, manos y pies curvados, y tono muscular pobre. Su padre, Hugh Rienhoff, quien había sido entrenado como genetista, reconoció que estos eran marcadores potenciales para un trastorno genético. Después de dos años y numerosas visitas a especialistas médicos en busca de un diagnóstico, los padres de Bea se quedaron sin ayuda. Frustrado, Rienhoff construyó un laboratorio genético improvisado en su casa y comenzó un proyecto personal, que eventualmente se llamaría "El Proyecto Bea", para identificar la mutación que, estaba seguro, existía en el genoma de su hija.

Según los síntomas de Bea, algunos de los cuales parecían similares a otras enfermedades genéticas conocidas, Rienhoff sospechaba que la mutación existía en algún lugar de la vía TGF-beta. Envió el DNA de Bea para tener miembros clave de la vía secuenciados y comparó las secuencias devueltas con aquellas en el genoma humano recientemente publicado. Al no hallar nada, amplió su búsqueda, reclutando la ayuda de expertos de la academia y la industria.

En 2009, Rienhoff recurrió a una compañía llamada Illumina, la cual estaba probando nuevos métodos que permitirían la secuenciación de la parte del genoma que codifica las proteínas (llamada el exoma). Convenció a la compañía para secuenciar los exomas de Bea y de miembros de la familia inmediata, como un caso de

(*continúa*)

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**10.1** Concepto de gen como una unidad de herencia
**10.2** El descubrimiento de cromosomas
**10.3** Cromosomas como portadores de información genética
**10.4** Análisis genético en la *Drosophila*
**10.5** Estructura del DNA
**10.6** **VÍAS EXPERIMENTALES:** Naturaleza química del gen
**10.7** DNA superenrollado
**10.8** Complejidad del genoma
**10.9** **PERSPECTIVA HUMANA:** Enfermedades que resultan de la expansión de las repeticiones de trinucleótidos
**10.10** Estabilidad del genoma: duplicación
**10.11** Naturaleza dinámica del genoma: "genes saltarines"
**10.12** Secuenciación de genomas: huellas de la evolución biológica
**10.13** Genómica comparada: "si se conserva, debe ser importante"
**10.14** Base genética del "ser humano"
**10.15** Variación genética dentro de la población de la especie humana
**10.16** **PERSPECTIVA HUMANA:** Aplicación de análisis genómicos a la medicina

prueba. Después de analizar los datos, se encontró un único punto mutante en un solo gen que codificaba la proteína TGF-beta3 en el exoma de Bea, pero no en el de ninguno de los otros miembros de la familia. A partir de experimentos en cultivo celular, los investigadores encontraron que la mutación puntual da como resultado una proteína no funcional que reduce la señalización global a través de la vía TGF-beta. Así que, hasta ahora, Bea Rienhoff es la única persona en el mundo que tiene esta mutación y el síndrome acompañante, aún sin nombrar. En la actualidad, se están realizando estudios para crear modelos animales, con el objetivo de comprobar si la mutación puede tener algún impacto a largo plazo en la salud, y el padre de Bea tiene la esperanza de que, finalmente, encontrará a otras personas con la misma mutación, que han llevado vidas largas y saludables.

## 10.1 Concepto de gen como una unidad de herencia

El concepto del gen ha experimentado una evolución notable a medida que los biólogos han aprendido más y más sobre la naturaleza de la herencia. Los primeros estudios revelaron que los genes son factores discretos que se retuvieron durante la vida de un organismo y luego se transmitieron a su progenie. Durante el siglo siguiente, se mostró que estos factores hereditarios residen en los cromosomas y están formados por DNA, una macromolécula con propiedades extraordinarias. En la **FIGURA 10-1** se proporciona una panorámica general de algunos de los primeros acontecimientos fundamentales, a lo largo de este notable viaje de descubrimiento, que finaliza con la descripción de la estructura doble helicoidal del DNA en 1953. En las décadas siguientes a este punto de inflexión, una rama importante de la biología molecular comenzó a centrarse en el **genoma**, que es el cuerpo colectivo de la información genética que está presente en una especie. Un genoma contiene todos los genes necesarios para "construir" un organismo en particular. Durante la última década más o menos, mediante colaboraciones entre los laboratorios de todo el mundo, se han descubierto las secuencias de nucleótidos completas de muchos genomas diferentes, incluidos el de nuestra propia especie y el del chimpancé, nuestro pariente vivo más cercano. Por primera vez en la historia de la humanidad, se tienen los medios para reconstruir la ruta genética de la evolución humana, comparando regiones correspondientes del genoma en organismos relacionados. Se pueden aprender cuáles regiones de nuestro genoma se han duplicado y cuáles se han perdido desde nuestra división a partir de un ancestro común; se pueden observar cuáles nucleótidos en un gen particular o región reguladora han sufrido cambios y cuáles han permanecido constantes; lo más importante, se puede inferir qué partes de nuestro genoma han estado sujetas a la selección natural y cuáles han estado libres para desviarse de manera aleatoria, a medida que pasa el tiempo. También se comenzó a usar esta información para conocer más sobre nuestra historia como especie: cuándo y dónde surgimos, cómo nos relacionamos entre nosotros y cómo llegamos a ocupar las regiones de la Tierra que habitamos.

La ciencia de la genética comenzó en la década de 1860 con el trabajo de Gregor Mendel, un fraile de la abadía de Santo Tomás, ubicada en la hoy República Checa. El laboratorio de Mendel era una pequeña parcela de jardín en los terrenos de la abadía. No se sabe exactamente qué motivó a Mendel a comenzar sus estudios, pero es evidente que tenía un claro plan experimental en mente: su objetivo era aparear, o *cruzar*, plantas de guisantes que tenían diferentes características hereditarias y determinar el patrón por el cual estas características eran transmitidas a la descendencia. Mendel eligió el guisante de jardín por varias razo-

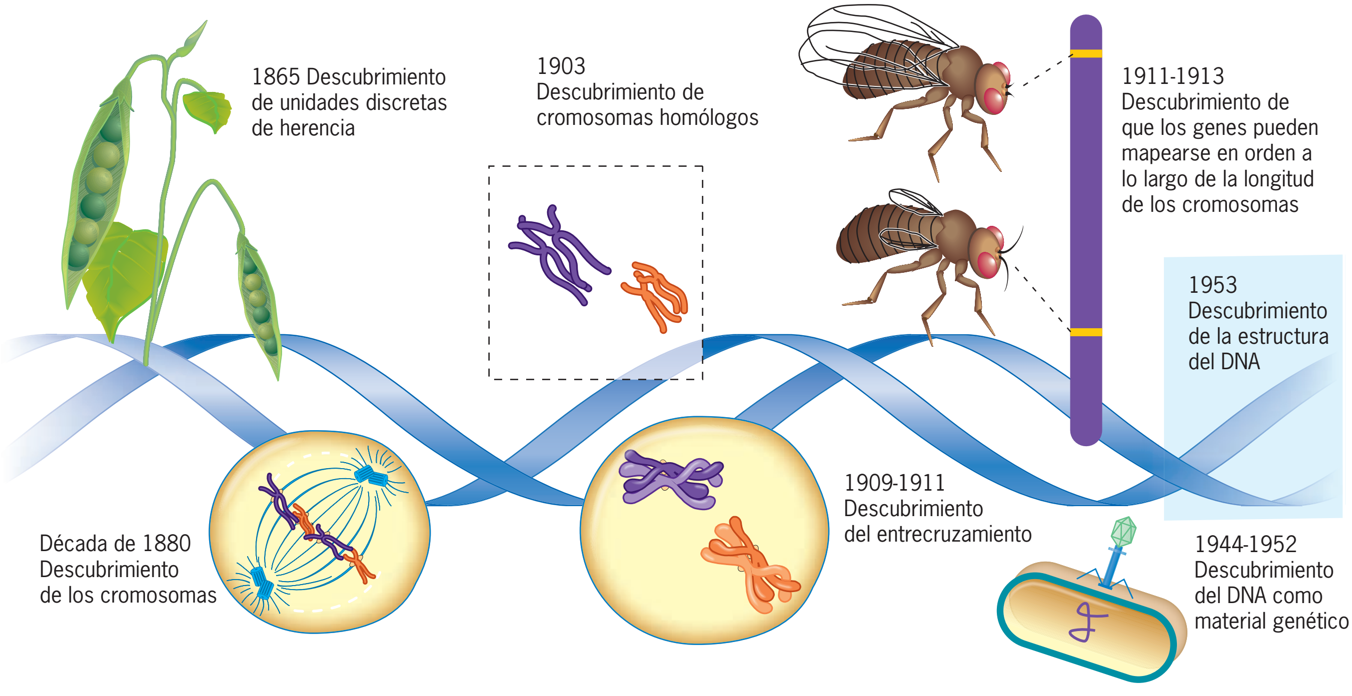



**FIGURA 10-1 Descripción que muestra varios de los descubrimientos tempranos más importantes sobre la naturaleza del gen.** Cada uno de estos descubrimientos se discute en el presente capítulo.

**TABLA 10-1 Siete rasgos de las plantas de guisantes de Mendel**

| Rasgo | Alelo dominante | Alelo recesivo |
|---|---|---|
| Altura | Alto | Enano |
| Color de semilla | Amarillo | Verde |
| Forma de la semilla | Redonda | Angular (arrugada) |
| Color de la flor | Púrpura | Blanco |
| Posición de la flor | A lo largo del tallo | En las puntas del tallo |
| Color de la vaina | Verde | Amarillo |
| Forma de la vaina | Inflada | Restringida |

(Consúltese www.mendelweb.org para una discusión sobre el trabajo de Mendel.)



nes prácticas, una de ellas era que podía comprar una variedad de semillas que daría lugar a plantas con características distintas. Mendel eligió enfocarse en siete rasgos visiblemente definibles, que incluyeron la altura de la planta y el color de la flor, cada uno de los cuales se produjo en dos formas alternativas e identificables con claridad (tabla 10.1). Mendel cruzó plantas a través de varias generaciones y contó el número de individuos que tenían varias características. Después de varios años de investigación, Mendel extrajo las siguientes conclusiones, que se expresan en la terminología genética moderna.

1. Las características de las plantas se rigen por distintos factores (o unidades) de herencia, que más tarde se denominaron **genes**. Una planta individual posee dos copias de un gen que controla el desarrollo de cada rasgo, uno derivado de cada padre. Las dos copias pueden ser idénticas entre sí o no. Las formas alternativas de un gen se llaman **alelos**. Para cada uno de los siete rasgos estudiados, uno de los dos alelos es dominante sobre el otro. Cuando ambos están presentes juntos en la misma planta, la existencia del alelo recesivo es enmascarada por la del dominante.
2. Cada célula reproductiva (o *gameto*) producida por una planta contiene sólo una copia de un gen para cada rasgo. Un gameto particular puede tener el alelo recesivo o el dominante para un rasgo dado, pero no ambos. Cada planta surge por la unión de un gameto macho y uno hembra. En consecuencia, uno de los alelos que rigen cada rasgo en una planta fue heredado de la progenitora y el otro alelo fue heredado del progenitor.
3. Aunque el par de alelos que gobierna un rasgo permanece junto a lo largo de la vida de una planta individual, se separan (o *segregan*) el uno del otro durante la formación de los gametos. Este hallazgo formó la base de la ley de segregación de Mendel.
4. La segregación del par de alelos para un rasgo no tiene ningún efecto sobre la segregación de alelos para otro rasgo. Un gameto particular, por ejemplo, puede recibir un gen paterno que rige el color de la semilla y un gen materno que rige la forma de la semilla. Este hallazgo formó la base de la ley de la distribución independiente de Mendel.

Mendel presentó los resultados de su trabajo a los miembros de la Sociedad de Historia Natural de Brünn; el acta de la reunión no registra la discusión de su presentación. Los experimentos de Mendel se publicaron en el diario de la sociedad Brünn en 1866, pero no generaron interés en absoluto hasta 1900, 16 años después de su muerte. En ese año, tres botánicos europeos llegaron a las mismas conclusiones de forma *independiente*, y los tres redescubrieron el artículo de Mendel, que había estado en los estantes de numerosas bibliotecas de toda Europa por 35 años.

**REPASO**

1. ¿Qué es un alelo y cuál es su relación con un gen?
2. Describa la ley de la distribución independiente de Mendel.

## 10.2 El descubrimiento de cromosomas

Aunque Mendel proporcionó evidencia convincente de que los rasgos hereditarios son gobernados por factores discretos, o genes, sus estudios no tuvieron en cuenta en lo absoluto la naturaleza física de estos elementos o su ubicación dentro del organismo. Durante el tiempo transcurrido entre el trabajo de Mendel y su redescubrimiento, varios biólogos se preocuparon de este otro aspecto de la herencia, su base física dentro de la célula.

En la década de 1880, varios biólogos europeos estaban siguiendo de cerca las actividades de las células y utilizando la rápida evolución de los microscopios ópticos para observar estructuras celulares recientemente discernibles. Ninguno de esos científicos conocía el trabajo de Mendel, sin embargo, entendieron que lo que fuera que gobernaba las características hereditarias, tendría que pasar de una célula a otra y de generación en generación. Esto, en sí mismo, fue una conclusión crucial; toda la información genética necesaria para construir y mantener una planta o animal complejo tenía que caber dentro de los límites de una sola célula. Las observaciones de la división celular realizadas por el biólogo alemán Walther Flemming, a principios de la década de 1880, revelaron que los contenidos citoplasmáticos eran enviados a una célula hija u otra por una cuestión de suerte, según el plano a través del cual el surco casualmente dividió la célula. Por el contrario, la célula parecía hacer todo lo posible para dividir los contenidos nucleares de manera equitativa entre las hijas. Durante la división celular, el material del núcleo se organizó en "filamentos" visibles, que fueron denominados **cromosomas**, lo que significa "cuerpo que se tiñe".

Alrededor de esa época, se observó el proceso de fertilización y se describieron las funciones de los dos gametos —el esperma y el óvulo— (**FIGURA 10-2**). Aunque el esperma es una célula pequeña, se supo que era tan importante genéticamente como el óvulo, mucho más grande. ¿Qué era lo que dos células muy diferentes tenían en común? La característica más visible fue el núcleo y sus cromosomas. La importancia de los cromosomas aportados por el macho se hizo evidente en un estudio realizado por el biólogo alemán Theodore Boveri en huevos de erizo de mar que habían sido fertilizados por dos espermatozoides en lugar de sólo uno, como suele ser el caso. Esta condición, conocida como *polispermia*, se caracteriza por divisiones celulares disruptivas y la muerte temprana del embrión. ¿Por qué debería la presencia de un núcleo de esperma extremadamente pequeño dentro de un óvulo muy grande, tener drásticas consecuencias? El segundo esperma dona un conjunto adicional de cromosomas y un centriolo extra (sección 9.5). Estos componentes adicionales conducen a divisiones celulares anormales en el embrión, durante las cuales las células hijas reciben números variables de cromosomas. Boveri concluyó que el proceso ordenado de desarrollo normal es "dependiente de una particular combinación de cromosomas; y esto sólo puede significar que los cromosomas individuales deben poseer cualidades diferentes." Esta fue la primera evidencia de una diferencia *cualitativa* entre los cromosomas.

Los eventos que ocurrieron después de la fertilización fueron seguidos más de cerca en la lombriz *Ascaris*, cuyos pocos cromosomas son grandes, y fueron observados tan fácilmente en el siglo XIX como en los laboratorios introductorios de biología de hoy. En 1883, el biólogo belga Edouard van Beneden notó que las células del cuerpo del gusano tenían cuatro grandes cromosomas, pero que los núcleos masculinos y femeninos presentes en el óvulo, justo después de la fertilización (antes de que los dos núcleos

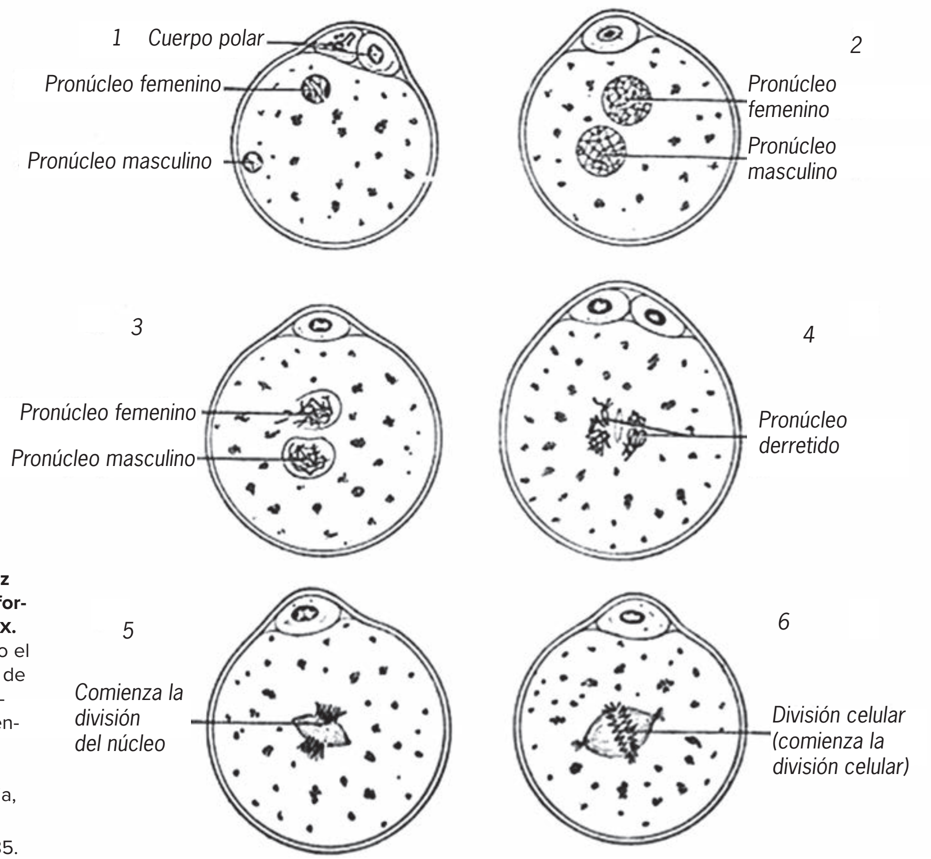



**FIGURA 10-2 Eventos que ocurren en la lombriz *Ascaris* después de la fertilización, como se informaron en una investigación clásica del siglo XIX.** Se observa que tanto el gameto masculino como el femenino contienen dos cromosomas. La fusión de los núcleos de espermatozoides y de óvulos (llamados pronúcleos) en el citoplasma del óvulo (entre *e* y *f*) produce un cigoto que contiene cuatro cromosomas. El segundo cuerpo polar que se muestra en a es un producto de la meiosis previa, como se describe en la sección 14.13.

FUENTE: De T. Boveri, *Jenaische Zeit* 1888;22:685.

se fusionaran entre sí), sólo tenían dos cromosomas cada uno (figura 10-2). Por este mismo tiempo, se describió el proceso de la meiosis, y en 1887 el biólogo alemán August Weismann propuso que la meiosis incluye una "división de reducción", durante la cual el número de cromosomas se reduce a la mitad, antes de la formación de los gametos. Si no ocurriera una división de reducción, y cada gameto contuviera el mismo número de cromosomas como una célula adulta, entonces la unión de dos gametos duplicaría el número de cromosomas en las células de la progenie. La cantidad de cromosomas se duplicaría con todas y cada una de las generaciones, lo que obviamente no ocurre y no puede ocurrir.[1]

**REPASO**

1. ¿Qué evidencia llevó a los primeros microscopistas a creer que los cromosomas contenían la información genética de la célula?

## 10.3 Cromosomas como portadores de información genética

El redescubrimiento del trabajo de Mendel y su confirmación tuvo una influencia inmediata en la investigación sobre biología celular. Cualquiera que sea su naturaleza física, los portadores de las unidades hereditarias tendrían que comportarse de manera consistente con los principios mendelianos. En 1903, Walter Sutton, un estudiante graduado en la Universidad de Columbia, publicó un artículo que señaló directamente a los cromosomas como los portadores físicos de los factores genéticos de Mendel. Sutton siguió el desarrollo de las células de espermatozoides en el saltamontes, que como *Ascaris*, tiene cromosomas grandes, observables con facilidad. Las células que dan lugar a los espermatozoides se denominan espermatogonias, y pueden sufrir dos tipos muy diferentes de división celular. Una espermatogonia puede dividirse por mitosis para producir más espermatogonias, o bien dividirse por meiosis para producir células que se diferencian en esperma (véase figura 14-41*a*). En el examen de las etapas mitóticas de las espermatogonias de los saltamontes, Sutton contó 23 cromosomas. Un cuidadoso examen de las formas y tamaños de los 23 cromosomas sugirió que estaban presentes en pares "parecidos". Once pares de cromosomas se pueden distinguir junto con un cromosoma adicional denominado *cromosoma accesorio* (que luego se mostró que era un cromosoma X determinante del sexo) que no era parte de un par obvio. Sutton se dio cuenta de que la presencia en cada célula de pares de cromosomas, o **cromosomas homólogos**, como fueron pronto denominados, se correlaciona perfectamente con los pares de factores hereditarios descubiertos por Mendel.

Cuando Sutton examinó los cromosomas en las células recién comenzada la meiosis, descubrió que los miembros de cada par de cromosomas estaban asociados entre sí, formando un complejo denominado *bivalente*. Once bivalentes eran visibles, cada uno mostrando una hendidura a lo largo de su longitud, donde los dos cromosomas homólogos se asociaron (**FIGURA 10-3**). La primera división meiótica subsiguiente separó los dos cromosomas homólogos en células separadas. Esta fue la división de reducción propuesta 15 años antes por Weismann sobre bases teóricas. Aquí también estaba la base física para van la propuesta de Mendel, de que existen factores hereditarios en pares que permanecen juntos a lo largo de la vida de un individuo y luego se separan unos de otros al formarse los gametos. La división de reducción observada

[1] Los lectores que han olvidado los eventos que ocurren durante la meiosis pudieran leer la sección 14.12, en la que se analiza este evento fundamental en el ciclo de vida de los organismos eucariotas.

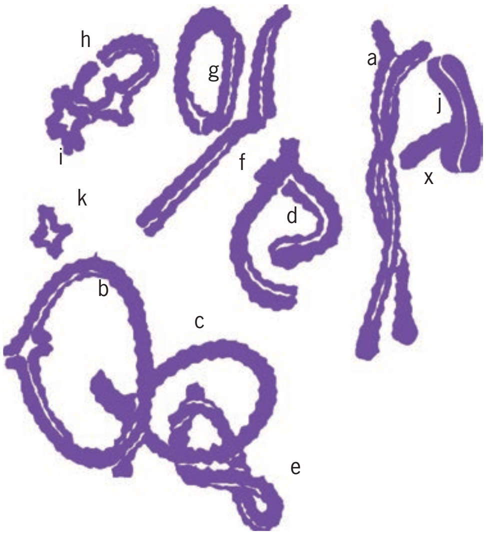



**FIGURA 10-3 Cromosomas homólogos.** Dibujo de Sutton de los cromosomas homólogos del saltamontes macho que se han asociado durante la profase meiótica para formar bivalentes. Se observaron once pares de cromosomas (*a-k*) homólogos y un cromosoma X no apareado.

FUENTE: WS Sutton. *Biol Bulletin* 1902;4:24. *Biological Bulletin* by Marine Biological Laboratory (Woods Hole, Mass.) Copyright 1902. Reproducido con permiso de Marine Biological Laboratory en el formato Textbook a través de Copyright Clearance Center.

por Sutton explicó varios de los otros hallazgos de Mendel: los gametos sólo podían contener una versión (alelo) de cada gen; la cantidad de gametos que contenía un alelo era igual al número que contenía el otro alelo; y la unión de dos gametos en la fertilización produciría un individuo con dos alelos para cada rasgo. Pero muchas preguntas quedaron sin respuesta. Por ejemplo, ¿cómo fueron organizados los genes dentro de los cromosomas?, ¿podía determinarse la ubicación de los genes específicos?

Con la misma claridad con que Sutton vio la relación entre el comportamiento de los cromosomas y los alelos de Mendel, notó un problema evidente. Mendel había examinado la herencia de siete rasgos y había encontrado que cada uno fue heredado independientemente de los demás. Esta observación formó la base de la ley de distribución independiente de Mendel. Pero, si los genes son empacados juntos en los cromosomas, como cuentas en una cadena, entonces los genes deben pasar de los padres a sus descendientes en paquetes, al igual que los cromosomas intactos pasan a la próxima generación. Los genes en el mismo cromosoma deberían actuar como si estuvieran *relacionados* entre sí; es decir, deben ser parte del mismo **grupo de relación**.

¿Cómo es que los siete rasgos de Mendel están distribuidos de forma independiente? ¿Estaban todos en diferentes grupos de relación, es decir, diferentes cromosomas? Como sucede, el guisante de jardín tiene siete pares de cromosomas homólogos. Los genes que gobiernan cada uno de los rasgos de Mendel se producen en cromosomas diferentes o están tan separados entre sí en el mismo cromosoma que actúan de forma independiente. La profecía de Sutton sobre los grupos de relación pronto fue confirmada. En un par de años, los genes para dos rasgos en los guisantes dulces (color de la flor y forma del polen) se mostraron ligados; otra evidencia rápidamente acumulada de la relación de los cromosomas.

## REPASO

1. ¿Qué es un grupo de relación? ¿Cuál es su relación con un cromosoma? ¿Cómo se puede determinar el número de grupos de relación en una especie?

## 10.4 Análisis genético en la *Drosophila*

La investigación en genética pronto se enfocó en un organismo en particular, la mosca de la fruta, *Drosophila* (**FIGURA 10-4**). Las moscas de la fruta tienen un tiempo de generación (desde el huevo hasta el adulto sexualmente maduro) de alrededor de 10 días y pueden producir hasta 1 000 huevos durante su vida. Además, las moscas de la fruta son muy pequeñas, por lo que se podría disponer de un gran número, son fáciles de albergar y criar, y muy económicas de mantener. En 1909, la mosca de la fruta parecía el organismo ideal para Thomas Hunt Morgan de la Universidad de Columbia. Así comenzó lo que iba a ser el inicio de una nueva era en la investigación genética. Hubo una gran desventaja en comenzar a trabajar con este insecto, sólo había una "cepa" de mosca disponible, el **tipo salvaje**. Mientras que Mendel simplemente había comprado variedades de semillas de guisantes, Morgan tuvo que generar sus propias variedades de moscas de la fruta. Morgan esperaba que apareciesen variantes del tipo salvaje si criaba suficientes moscas. En un año —después de observar miles de moscas— encontró su primer **mutante**, es decir, un individuo con una característica heredable que lo distinguía del tipo salvaje. El mutante tenía ojos blancos en lugar de los normales de color rojo (figura 10-4).

En 1915, Morgan y sus alumnos habían encontrado 85 diferentes mutantes con una amplia variedad de estructuras afectadas. Era evidente que, en raras ocasiones, se produce un cambio espontáneo o **mutación** dentro de un gen, alterándolo permanentemente, de forma que el rasgo alterado se transmite de generación en generación. La demostración de una alteración hereditaria de forma espontánea en un gen tuvo consecuencias mucho más allá del estudio de la genética de la *Drosophila*. Sugirió un mecanismo para el origen de la variación que existe dentro de las poblaciones, evidencia de un enlace vital en la teoría de la evolución. Si pudieran surgir variantes de genes de modo espontáneo, las poblaciones aisladas podrían volverse genéticamente diferentes entre sí y, en última instancia, dar lugar a nuevas especies.

Mientras que las mutaciones son una ocurrencia necesaria para la evolución, para los genetistas constituyen una herramienta, porque proporcionan una diferencia a la condición de tipo salvaje. Al estar aislados, los mutantes de *Drosophila* se criaron, cruzaron y mantuvieron como reservas dentro del laboratorio. Como se esperaba, las 85 mutaciones no se agruparon todas independientemente; en cambio, Morgan encontró que pertenecían a cuatro grupos de relación diferentes, uno de los cuales



**FIGURA 10-4 La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.** Fotografía de una mosca de la fruta femenina de tipo salvaje y un macho mutante que tiene una mutación que causa los ojos blancos.

FUENTE: Cortesía de Stanley JP Iyadurai.

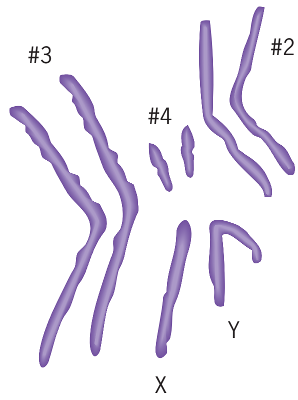



**FIGURA 10-5 Las moscas de la fruta tienen cuatro pares de cromosomas homólogos, uno de los cuales es muy pequeño.** Los dos homólogos disímiles son los cromosomas que determinan el sexo. Al igual que en los seres humanos, las moscas de la fruta macho son XY y las hembras son XX.

contenía muy pocos genes mutantes (sólo dos en 1915). Este hallazgo se correlacionó de manera adecuada con la observación de que las células de *Drosophila* tienen cuatro pares de cromosomas homólogos, uno de los cuales es muy pequeño (**FIGURA 10-5**). Quedó poca duda de que los genes residen en cromosomas.

## Entrecruzamiento y recombinación

A pesar de que se confirmó la asociación de genes en los grupos de relación, se encontró que la relación entre los alelos en el mismo cromosoma era *incompleta*. En otras palabras, los alelos de dos genes diferentes, como alas cortas y cuerpo negro (como en la figura 10-7), que originalmente estaban presentes juntos en un cromosoma dado, no siempre permanecieron juntos durante la producción de gametos. Por tanto, las características mateRNA y pateRNA que fueron heredadas por un individuo en cromosomas homólogos separados podrían reorganizarse de modo que terminen en el mismo cromosoma de un gameto. Por el contrario, dos características que se heredaron juntas en el mismo cromosoma podrían separarse una de la otra y terminar en gametos separados.

En 1911, Morgan ofreció una explicación para la "ruptura" en el ligamiento. Dos años antes, F. A. Janssens había observado que los cromosomas homólogos de bivalentes se envolvieron uno alrededor del otro durante la meiosis (**FIGURA 10-6**). Janssens había propuesto que esta interacción entre los cromosomas maternos y paternos dio lugar a la ruptura e intercambio de piezas. Aprovechando esta propuesta, Morgan sugirió que este fenómeno, que denominó ***entrecruzamiento*** (o **recombinación genética**), podría explicar la apariencia de descendientes (*recombinantes*) que tienen combinaciones inesperadas de rasgos genéticos. Un ejemplo del entrecruzamiento se muestra en la **FIGURA 10-7**.

El análisis de la descendencia de un gran número de cruzamientos entre adultos portadores de una variedad de alelos en el mismo cromosoma indicó que 1) el porcentaje de recombinación entre un par de genes dado en un cromosoma, como el color de los ojos y la longitud del ala, era esencialmente constante de un experimento a otro; y 2) los porcentajes de recombinación entre diferentes pares de genes, tales como entre el color de los ojos y la longitud del ala *versus* el color de los ojos y el color del cuerpo, podría ser muy diferente.

El hecho de que un par dado de genes proporcionara la misma frecuencia aproximada de recombinación en cada cruce sugirió de manera marcada que las posiciones de los genes a lo largo del cromosoma (sus ***loci***) eran fijas y no variaban de una mosca a otra. Si el *locus* de cada gen es fijo, entonces la frecuencia de recombinación entre dos genes provee una medida de la distancia que separa a los dos genes. Cuanto más espacio exista entre dos sitios en un cromosoma para que ocurra la rotura, más probable es que se produzca una rotura entre esos dos sitios y, por tanto,

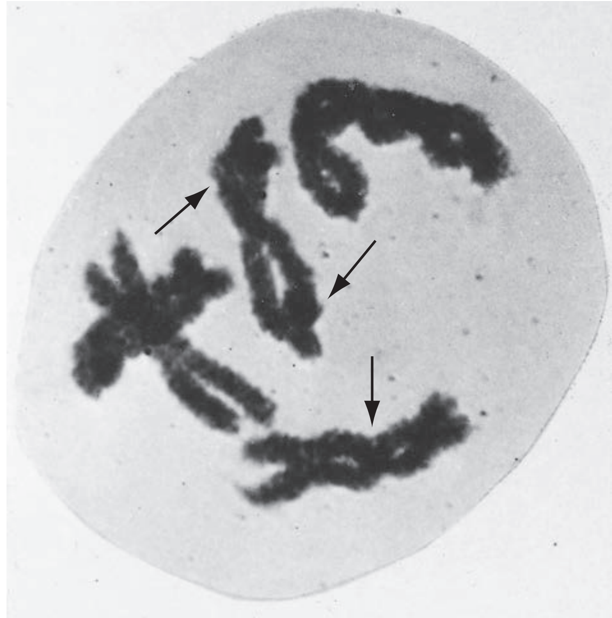


**FIGURA 10-6 Visualización de los sitios de entrecruzamiento.** Cromosomas homólogos se envuelven mutuamente durante la meiosis, como se observa en esta micrografía de una célula meiótica de un lirio. Los puntos en los que se cruzan los homólogos se denominan quiasma (flechas) y (como se discute en el capítulo 14) son sitios en los cuales el entrecruzamiento se había producido en una etapa anterior.

FUENTE: De AH Sparrow. *Annals of the Nueva York Academy de Sciences*, 1508, 1951. Este material se usa con el permiso de John Wiley & Sons.

mayor será la frecuencia de recombinación. En 1911, un estudiante universitario no graduado de la Universidad de Columbia, Alfred Sturtevant, quien estaba trabajando en el laboratorio de Morgan, concibió la idea de que las frecuencias de recombinación podrían utilizarse para mapear las posiciones relativas de genes individuales a lo largo de un determinado cromosoma. Un ejemplo de los principios subyacentes de este procedimiento de mapeo se ilustra en la figura 10-7. En dicho ejemplo, los genes para la longitud del ala y el color del cuerpo de la *Drosophila* están situados a una distancia considerable unos de otros en el cromosoma y, por consiguiente, es probable que queden desligados por una ruptura y un cruce intermedios. Por el contrario, los genes para el color de los ojos y el color del cuerpo se encuentran muy cerca unos de otros en el cromosoma y, como consecuencia, son menos propensos a desligarse. Con el uso de frecuencias de recombinación, Sturtevant, quien se convirtió en uno de los genetistas más prominentes del siglo, comenzó a construir mapas detallados del orden seriado de los genes a lo largo de cada uno de los cuatro cromosomas de la mosca de la fruta. Desde entonces, las frecuencias de recombinación se han utilizado para preparar mapas cromosómicos a partir de virus y bacterias, así como de una gran variedad de especies eucariotas.

## Mutagénesis y cromosomas gigantes

Durante el periodo inicial de la genética, la búsqueda de mutantes fue un procedimiento lento y tedioso, dependiente de la aparición *espontánea* de genes alterados. En 1927, se utilizó una variedad especial de moscas de la fruta diseñada para revelar la presencia de alelos recesivos. H. J. Muller descubrió que las moscas sometidas a una dosis subletal de rayos X mostraron más de 100 veces la tasa de mutación espontánea exhibida por controles no irradiados. Este hallazgo tuvo consecuencias importantes. Desde el punto de vista práctico, el uso de agentes mutagénicos, como rayos X y radiación ultravioleta, aumentó en gran medida la cantidad de mutantes disponibles para la investigación genética. El hallazgo también señaló el peligro del creciente uso de la

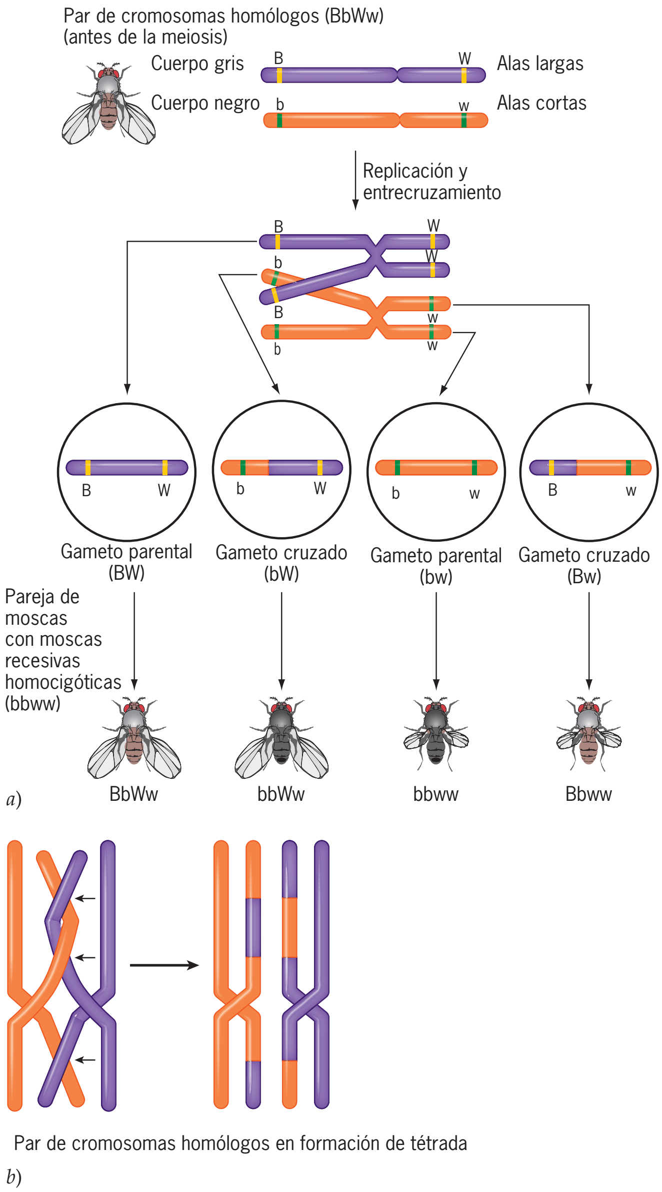



**FIGURA 10-7 El entrecruzamiento proporciona el mecanismo para reorganizar a los alelos entre cromosomas maternos y paternos.** *a*) Representación simplificada de un solo cruce en un heterocigoto de *Drosophila* (BbWw) en el cromosoma número 2 y los gametos resultantes. Si cualquiera de los gametos que se cruzan participa en la fertilización, la descendencia tendrá un cromosoma con una combinación de alelos que no estaba presente en un solo cromosoma en las células de cualquiera de los padres. *b*) Formación bivalente (tétrada) durante la meiosis, que muestra tres intersecciones cruzadas (quiasma, indicado por las flechas negras).

radiación en el campo de la industria y la medicina. En la actualidad, las mutaciones en la *Drosophila* se generan con mayor frecuencia al agregar un mutágeno químico (metanosulfonato de etilo) al alimento de los insectos.

El redescubrimiento en 1933 de cromosomas gigantes en ciertas células de insectos por Theophilus Painter, de la Universidad de Texas, ilustra un principio básico en biología. Existe una variabilidad tan notable entre organismos, no sólo en los niveles macroscópicos obvios, sino también en los niveles celulares y subcelulares, que a menudo un tipo particular de célula puede ser mucho más adecuado para un tipo particular de investigación que otro. Las células de la glándula salival larval de la *Drosophila* contienen cromosomas que son, aproximadamente, 100 veces más gruesos que los cromosomas encontrados en la mayoría de las otras células del organismo (**FIGURA 10-8*a***). Durante el desa-

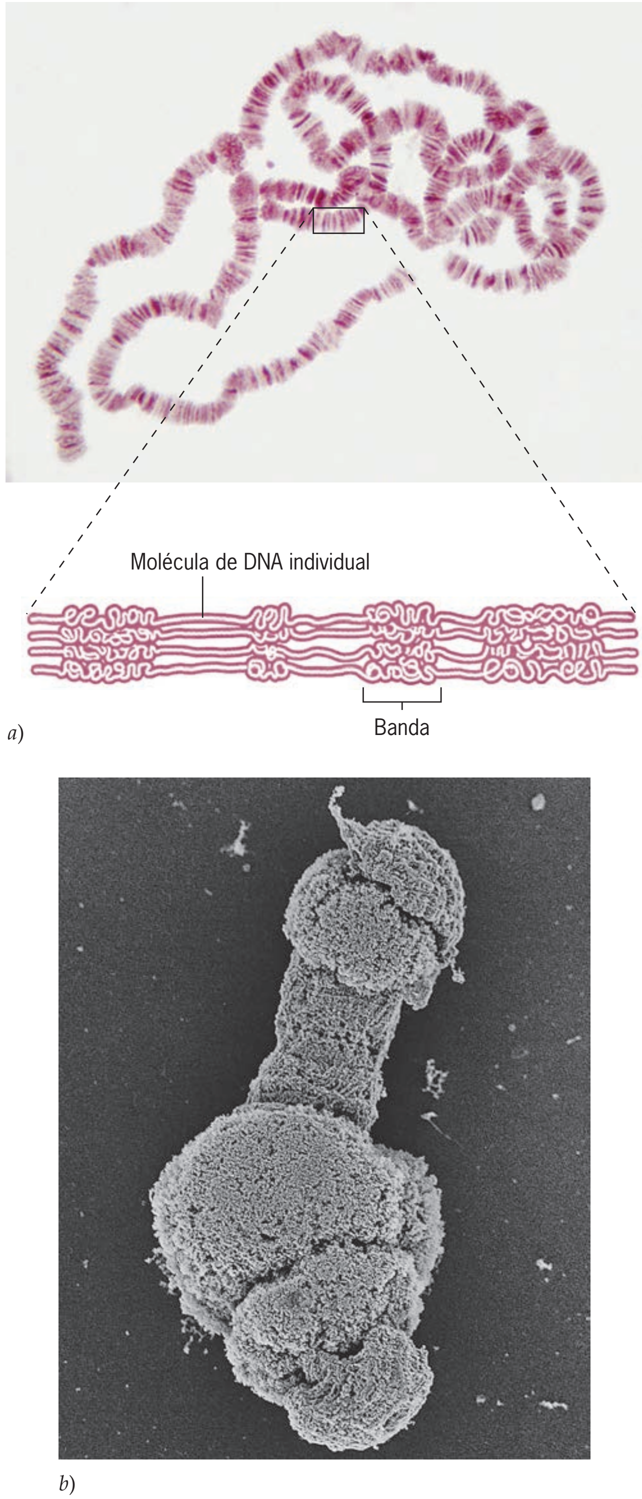



**FIGURA 10-8 Cromosomas politénicos gigantes de insectos larvarios.** *a*) Estos cromosomas politénicos gigantes de la glándula salival de una larva de una mosca de la fruta muestran varios miles de bandas distintas y oscuras. Las bandas han sido identificadas como los *loci* de genes particulares. En el recuadro se detalla cómo los cromosomas politénicos consisten en varias moléculas de DNA individuales. Las bandas teñidas en los cromosomas corresponden a los sitios donde el DNA está más compacto. *b*) Microfotografía electrónica de barrido de un cromosoma politénico gigante de una larva de *Chironomus* que muestra cómo los sitios específicos se expanden para formar una "protuberancia". Las protuberancias cromosómicas son sitios donde el DNA se transcribe activamente.

FUENTE: *a*) Andrew Syred/Photo Researchers, Inc. Reproducido con permiso de Company of Biologists, Ltd.; *b*) Tomada de Terry Allen y Claus Pelling, *J Cell Science*, cubierta del vol. 93, parte 4, 1989. Reproducida con el permiso de Company of Biologists, Ltd.

rrollo larval, estas células dejan de dividirse, pero se mantienen creciendo. La replicación de DNA continúa proporcionando el material genético adicional necesario para soportar el alto nivel de actividad secretora de estas enormes células. Las cadenas de DNA duplicadas permanecen unidas entre sí, en perfecta alineación lado a lado (recuadro de figura 10-8*a*), produciendo cromosomas gigantes con hasta 1 024 veces el número de cadenas de DNA de cromosomas normales.

Estos inusuales **cromosomas politénicos**, como se les denomina, son ricos en detalles visuales, mostrando alrededor de 5 000 bandas cuando se tiñen y se examinan de forma microscópica. El patrón de bandas es en esencia constante de un individuo a otro, pero se observan diferencias considerables entre los cromosomas de las moscas de diferentes especies del género *Drosophila*. Painter pronto encontró que las bandas individuales podrían correlacionarse con genes específicos. Las posiciones relativas de estos genes en los cromosomas gigantes concuerdan con aquellas predichas sobre la base de mapas genéticos preparados a partir de las frecuencias de recombinación, lo que proporciona una confirmación visual de la validez de todo el procedimiento de mapeo.

Los cromosomas de insectos gigantes han sido útiles de otras maneras. Las comparaciones de patrones de bandas entre cromosomas politénicos de diferentes especies han proporcionado una oportunidad sin precedentes para la investigación de cambios evolutivos a nivel cromosómico. Además, estos cromosomas no son objetos celulares inertes, sino estructuras dinámicas en las que ciertas regiones se "hinchan" en etapas particulares de desarrollo (figura 10-8*b*). Estas protuberancias de los cromosomas son sitios donde el DNA se transcribe a un nivel muy alto, brindando uno de los mejores sistemas disponibles para la visualización directa de la expresión génica.



**FIGURA 10-9 Modelo de DNA construido por James Watson y Francis Crick en la Universidad de Cambridge, 1953.**
FUENTE: Ciencia y Sociedad/SuperStock.

**REPASO**

1. ¿Cómo ayudan las mutaciones genéticas a mapear la ubicación de los genes en un cromosoma?
2. ¿Qué se entiende por ligamiento incompleto? ¿Qué tiene que ver esto con el emparejamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis?
3. ¿Cómo difieren los cromosomas politénicos de un insecto de los cromosomas normales?

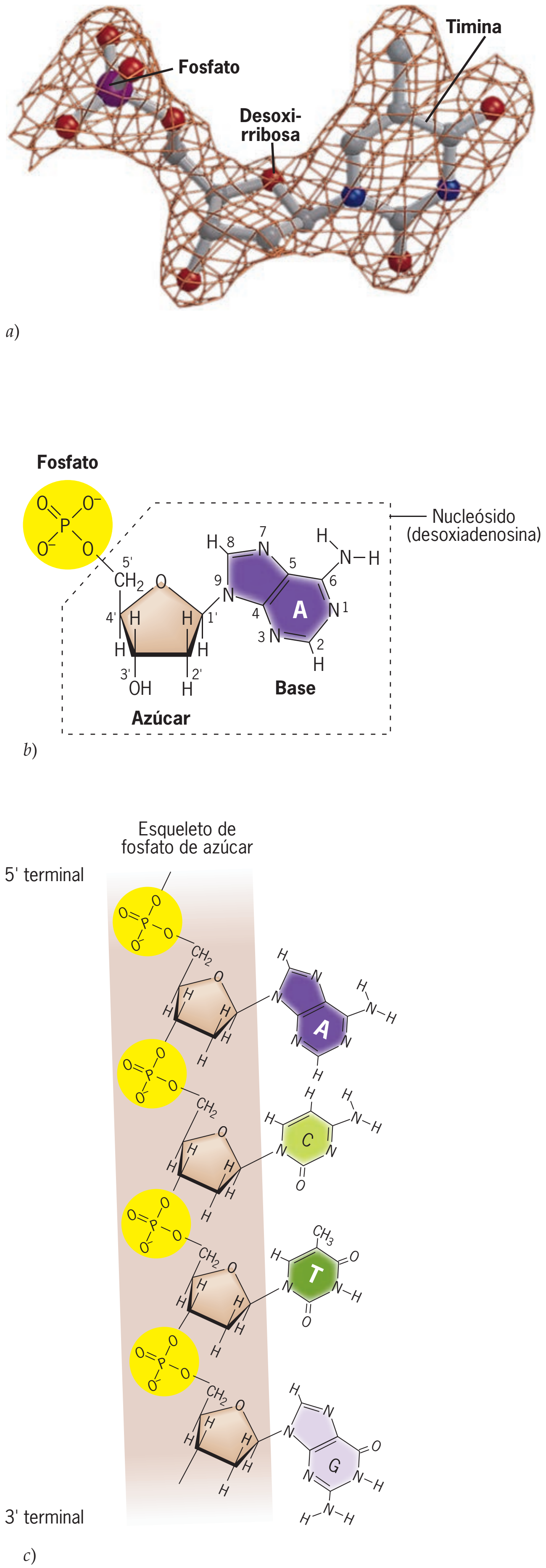
## 10.5 Estructura del DNA

Los genetistas clásicos descubrieron las reglas que rigen la transmisión de las características genéticas y la relación entre los genes y los cromosomas. En su discurso de aceptación del Premio Nobel en 1934, T. H. Morgan declaró: "en el nivel en que se encuentran los experimentos genéticos, no hace la más mínima diferencia si el gen es una unidad hipotética o si el gen es una partícula material." Sin embargo, en la década de 1940, se tomó en consideración un nuevo conjunto de preguntas, de las cuales la principal fue: "¿cuál es la naturaleza química del gen?" Los experimentos que responden a esta pregunta se describen en "Vías Experimentales" (sección 10.6). Una vez que se hizo evidente que los genes están hechos de DNA, los biólogos se enfrentaron a una serie de nuevas interrogantes. Estas se abordarán en el resto del capítulo.

Para comprender el funcionamiento de una macromolécula compleja —ya sea una proteína, un polisacárido, un lípido o un ácido nucleico— es esencial conocer cómo se construye esa molécula. El misterio de la estructura del DNA fue objeto de investigación en varios laboratorios en Estados Unidos e Inglaterra a principios de la década de 1950, y fue resuelto por James Watson y Francis Crick en la Universidad de Cambridge en 1953 (**FIGURA 10-9**). Antes de describir su propuesta de la estructura del DNA, vamos a reflexionar sobre los hechos disponibles en ese momento.

Se conocía que el bloque de construcción básico del DNA era un **nucleótido** (**FIGURA 10-10*a*,*b***), que consiste en el azúcar *desoxirribosa* de cinco carbonos, para la cual un fosfato se esterifica en la posición 5′ del anillo de azúcar y una base nitrogenada se une en el sitio 1′.[2] Dos tipos de bases nitrogenadas están presentes en un ácido nucleico: las **pirimidinas**, que contienen un solo anillo, y las **purinas**, que contienen dos anillos (figura 10-10*c*). El DNA contiene dos pirimidinas diferentes, la *timina* (T) y la *citosina* (C), así como dos purinas diferentes, la *guanina* (G) y la *adenina* (A). Los nucleótidos están unidos de manera covalente entre sí para formar un polímero lineal, o *cadena*, con un esqueleto compuesto de grupos alternados de azúcar y fosfato unidos por *enlaces fosfodiéster* 3′- 5′ (figura 10-10*c*). Se pensó que las bases unidas a cada azúcar se proyectaban desde el esqueleto como una columna de estantes apilados.

[2] Es útil introducir un poco de terminología en este punto. Una molécula que consiste simplemente en una de las cuatro bases nitrogenadas de la figura 10-10 unida a un resto de azúcar pentosa, se conoce como nucleósido. Si el azúcar es desoxirribosa, el nucleósido es un desoxirribonucleósido. Existen cuatro desoxirribonucleósidos principales que se distinguen por su base unida: desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina y desoxicitidina. Si el nucleósido tiene uno o más grupos fosfato unidos (generalmente en la posición 5, pero de forma alternativa en la posición 3), la molécula es un nucleótido. Hay nucleósidos 5′-monofosfatos, nucleósidos 5′-difosfatos y nucleósidos 5′-trifosfatos, en dependencia del número de fosfatos en la molécula. Los ejemplos de cada uno son 5′-monofosfato de desoxiadenosina (dAMP, *deoxyadenosine 5monophosphate*), 5′-difosfato de desoxiguanosina (dGDP, *deoxyguanosine 5diphosphate*) y 5′-trifosfato de desoxicitidina (dCTP, *deoxycytidine 5triphosphate*). Un conjunto similar de nucleósidos y nucleótidos involucrados en el metabolismo de RNA contiene el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa. Los nucleótidos empleados en el metabolismo energético, como el trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*), son moléculas que contienen ribosa.




Un nucleótido tiene una estructura polarizada: un extremo, donde se encuentra el fosfato, se llama *5′ terminal* (pronunciado "cinco prima terminal"), mientras que el otro extremo es el *3′ terminal* (figura 10-10*b*). Debido a que los nucleótidos apilados en una cadena miran en la misma dirección, la cadena entera tiene una dirección (figura 10-10*c*). El análisis de la difracción de rayos X indicó que la distancia entre los nucleótidos de la pila era 3.4 Å (0.34 nm), lo que sugirió la presencia de una gran repetición estructural cada 3.4 nm.

Como se discutió en la sección 10.6, durante muchos años se pensó que el DNA consistía en una simple repetición de tetranucleótidos (p. ej. —ATGCATGCATGC—), lo que hacía poco probable que sirviera como macromolécula informativa. En 1950, Erwin Chargaff, de la Universidad de Columbia, informó un hallazgo importante que dio el golpe final a la teoría de los tetranucleótidos y proporcionó información vital sobre la estructura del DNA. Chargaff, creyendo que la secuencia de nucleótidos de la molécula de DNA tenía la clave de su importancia, determinó las cantidades relativas de cada base en varias muestras de DNA, es decir, la **composición de base** de las muestras. El análisis de la composición de base de una muestra de DNA se realizó mediante la hidrolización de las bases de sus azúcares unidos, la separación de las bases en el hidrolizado mediante cromatografía en papel, y la determinación de la cantidad de material en cada uno de los cuatro puntos a los que migraron las bases.

Si la teoría de los tetranucleótidos fuera correcta, cada una de las cuatro bases en una muestra de DNA estaría presente como en un 25% del número total. Chargaff descubrió que las relaciones de las cuatro bases componentes eran bastante variables de un tipo de organismo a otro, siendo a menudo muy diferente de la relación 1:1:1:1 predicha por la teoría del tetranucleótido. Por ejemplo, la relación A:G del DNA de un bacilo tuberculoso fue de 0.4, mientras que la relación A:G del DNA humano fue de 1.56. No hizo ninguna diferencia qué tejido vegetal o animal se utilizó como fuente de DNA; la composición de base se mantuvo constante para esa especie. En medio de esta gran variabilidad en la composición de base de DNA de diferentes especies, se descubrió una relación numérica importante. Los números de purinas siempre igualaron el número de pirimidinas en una muestra dada de DNA. Más específicamente, la cantidad de adeninas siempre igualó a la de timinas, y el número de guaninas siempre equiparó a la cantidad de citosinas. En otras palabras, Chargaff descubrió las siguientes reglas de composición de base de DNA:

$$[A] = [T], [G] = [C], [A] + [T] \neq [G] + [C]$$

Los hallazgos de Chargaff ponen a la molécula de DNA bajo una nueva luz, dándole especificidad e individualidad de un organismo a otro. Sin embargo, el significado de las equivalencias de base permaneció oscuro.

## La propuesta de Watson-Crick

Cuando se discutió la estructura de la proteína en el capítulo 2, se enfatizó en la importancia de las estructuras secundaria y terciaria como determinantes de la actividad de la proteína. De manera

**FIGURA 10-10 Estructura química del DNA.** *a*) Modelo de nucleótido de DNA que contiene la base timina; la molécula es 5′-monofosfato de desoxitimidina (dTMP, *deoxythymidine* 5′-*monophosphate*). La jaula de red representa la densidad electrónica de los átomos que componen la molécula. *b*) Estructura química de nucleótido de DNA que contiene la base adenosina; la molécula es 5′-monofosfato de desoxiadenosina (dAMP, *deoxyadenosine* 5-*monophosphate*). Un nucleótido se compone de un nucleósido unido a un fosfato; la porción de nucleósido de la molécula (es decir, desoxiadenosina) está encerrada por la línea de puntos. *c*) Estructura química de un pequeño segmento de una cadena única de DNA que muestra los cuatro nucleótidos.

FUENTE: *a*) Tomada de Arnon Lavie, *et al*. *Nature Str Biol* 1997;4:604, Fig. 2a. Reproducido con permiso de Macmillan Publishers Limited.

similar, se necesitaba información sobre la organización tridimensional del DNA, si se quería entender su actividad biológica. Con el uso de datos de difracción de rayos X (obtenidos por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins en el King's College de Londres) y modelos construidos a partir de cortes de los cuatro tipos de nucleótidos, Watson y Crick propusieron una estructura de DNA que incluía los siguientes elementos (figura 10-10):

1. La molécula está compuesta de dos cadenas de nucleótidos. Esta conclusión pisó los talones de una propuesta errónea de Linus Pauling, quien había sugerido que el DNA estaba compuesto por tres cadenas de nucleótidos.
2. Las dos cadenas giran una alrededor de la otra para formar un par de hélices a la derecha. En una hélice a la derecha, un observador que mira por el eje central de la molécula vería que cada cadena sigue un camino en el sentido de las agujas del reloj, a medida que se aleja del observador. La naturaleza helicoidal del DNA se reveló en el patrón de manchas producido por la imagen de difracción de rayos X de Franklin, que se mostró a Watson durante una visita al King's College.
3. Las dos cadenas que comprenden una doble hélice corren en direcciones opuestas**;** es decir, son *antiparalelas*. Por tanto, si una cadena está alineada en la dirección 5′→ 3′, su compañera debe estar alineada en la dirección 3′ → 5′.
4. El esqueleto de azúcar-fosfato-azúcar-fosfato de cada cadena se encuentra en el exterior de la molécula con los dos conjuntos de bases que se proyectan hacia el centro. Los grupos de fosfato proporcionan a la molécula una gran carga negativa (**FIGURA 10-11*a***).
5. Las bases ocupan planos que son aproximadamente perpendiculares al largo eje de la molécula y, por tanto, están apilados uno encima de otro como un montón de platos. Las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas de van der Waals (página 36) entre las bases apiladas y planas proporcionan estabilidad para toda la molécula del DNA. Juntos, los giros helicoidales y los pares de bases planas causan que la molécula se parezca a una escalera de caracol. Esta forma de construcción es evidente en la fotografía de la figura 10-9, que muestra el modelo original de Watson-Crick.
6. Las dos cadenas se mantienen juntas por enlaces de hidrógeno entre cada base de una cadena y una base asociada en la otra cadena. Debido a que los enlaces de hidrógeno individuales son débiles y se rompen con facilidad, las cadenas de DNA pueden separarse durante varias actividades. Pero se añade la fortaleza de las uniones de los enlaces de hidrógeno, y la gran cantidad de enlaces de hidrógeno que tienen las cadenas juntas hacen que la doble hélice sea una estructura estable.
7. La distancia desde el átomo de fósforo del esqueleto al centro del eje es de 1 nm (por tanto, el ancho de la doble hélice es de 2 nm).
8. Una pirimidina en una cadena siempre se combina con una purina en la otra cadena. Esta disposición produce una molécula que tiene 2 nm de ancho en toda su longitud.
9. Los átomos de nitrógeno unidos al carbono 4 de la citosina y al carbono 6 de la adenina se encuentran de forma predominante en la configuración amino ($NH_2$) (figura 10-10*c*), en lugar de en la forma imino (NH). Del mismo modo, los átomos de oxígeno unidos al carbono 6 de guanina y al carbono 4 de timina tienen preponderancia en una configuración ceto (C═O), en vez de en la forma enol (C—OH). Estas restricciones estructurales en las configuraciones de las bases sugirieron que la adenina era la única purina estructuralmente capaz de unirse a la timina, y que la guanina era la única purina capaz de unirse a la citosina. Por tanto, los únicos pares posibles fueron A-T y G-C (figura 11-11*c*). Esto se ajusta de manera perfecta con el análisis de la composición de base llevado a cabo por Chargaff, cuyos resultados fueron comunicados a Watson y Crick durante una reunión de los tres científicos en Cambridge en 1952. Debido a que un par de bases A-T y G-C tenía la misma geometría (figura 10-11*c*), no hubo restricciones en la secuencia de bases; una molécula de DNA podría tener cualquiera de una variedad ilimitada de secuencias de nucleótidos.
10. Los espacios entre giros adyacentes de la hélice forman dos surcos de diferente ancho —un *surco mayor* más ancho y un *surco menor* más estrecho— esa espiral alrededor de la superficie externa de la doble hélice (figura 10-11*a,b*). Las proteínas que se unen al DNA a menudo contienen dominios que encajan en estos surcos. En muchos casos, una proteína unida en un surco es capaz de leer la secuencia de nucleótidos a lo largo del DNA sin tener que separar las cadenas.
11. La doble hélice hace un giro completo cada 10 residuos (3.4 nm) o 150 vueltas por millón de daltons de masa molecular.
12. Debido a que una A en una cadena siempre está unida a una T en la otra cadena, y una G siempre está unida a una C, las secuencias de nucleótidos de las dos cadenas siempre están fijas en relación unas con otras. Debido a esta relación, se dice que las dos cadenas de doble hélice son **complementarias** entre sí. Por ejemplo, A es complementaria a T, 5′-AGC-3′ es complementaria a 3′-TCG-5′, y una cadena completa es complementaria a la otra. Como se observará, la complementariedad es de primordial importancia en casi todas las actividades y mecanismos en los que están involucrados los ácidos nucleicos.

## Importancia de la propuesta de Watson-Crick

Desde el momento en que los biólogos consideraron por primera vez el DNA como el material genético, se esperó que cumpliera tres funciones principales (**FIGURA 10-12**):

1. ***Almacenamiento de información genética***. Como material genético, el DNA debe contener un registro almacenado de instrucciones que determinen todas las características hereditarias que exhibe un organismo. En términos moleculares, el DNA debe contener la información necesaria para ensamblar todas las proteínas que se sintetizan en un organismo (figura 10-12*a*).
2. ***Replicación y herencia***. El DNA debe contener la información para la síntesis de nuevas cadenas de DNA (replicación). La replicación del DNA permite que las instrucciones genéticas se transmitan de una célula a sus células hijas y de un individuo a su descendencia (figura 10-12*b*).
3. ***Expresión del mensaje genético***. El DNA es más que un centro de almacenamiento, también es un director de la actividad celular. En consecuencia, la información codificada en el DNA debe expresarse de alguna forma que pueda tomar parte en los eventos que tienen lugar dentro de la célula. De forma más específica, la información en el DNA debe usarse para dirigir el orden por el cual los aminoácidos específicos se incorporan a la cadena del polipéptido (figura 10-12*c*).

El modelo de estructura del DNA de Watson-Crick sugirió una forma en la cual las dos primeras de estas tres funciones genéticas podrían lograrse. El modelo apoyó firmemente la sospecha de que el contenido de información del DNA residía en la secuencia lineal de sus bases. Un segmento dado de DNA correspondería a cada gen. La secuencia específica de nucleótidos en ese segmento dictaría la secuencia de aminoácidos en un polipéptido correspondiente. Un cambio en la secuencia lineal de nucleótidos dentro de ese segmento equivaldría a una mutación hereditaria en ese gen. Se supuso que las diferencias en la secuencia del nucleótido forman la base de la variación genética, ya sea entre individuos de una especie o entre especies. Como se estudiará en el próximo

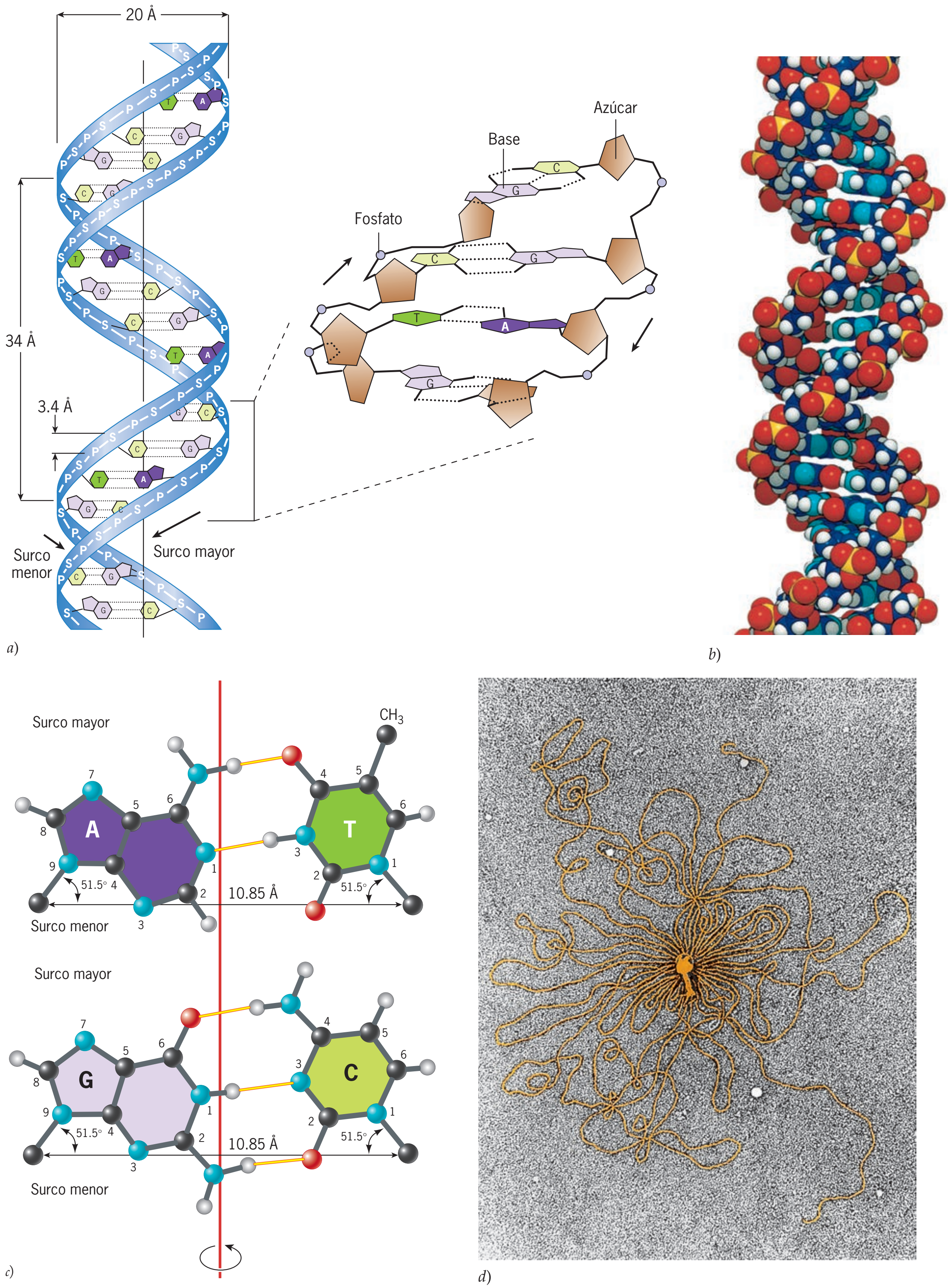



**FIGURA 10-11 La doble hélice.** *a*) Representación esquemática de la doble hélice del DNA. *b*) Modelo de relleno de espacio de la forma B del DNA. *c*) Pares de bases Watson-Crick. El modelo original mostró pares A-T y G-C con dos enlaces de hidrógeno; el tercer enlace de hidrógeno en el par G-C fue identificado posteriormente por Linus Pauling. *d*) Micrografía electrónica de DNA que se libera de la cabeza de un bacteriófago T2. Esta molécula de DNA lineal (nótese los dos extremos libres) mide 68 μm de longitud, cerca de 60 veces más que la cabeza del fago en la que está contenida.

FUENTE: *b)* Cortesía de Nelson Max, Laboratorio Nacional Lawrence Livermore y el Departamento de Energía; *c*) Figura 28-6 en la página 854 de Voet y Voet, *Biochemistry* 2e; copyright 1995, John Wiley & Sons, Inc. Este material se reproduce con el permiso de John Wiley & Sons, Inc.; *d*) tomada de AK Kleinschmidt, *et al*. *Biochim Biophys* Acta 1962;61:861, con el permiso de Elsevier.

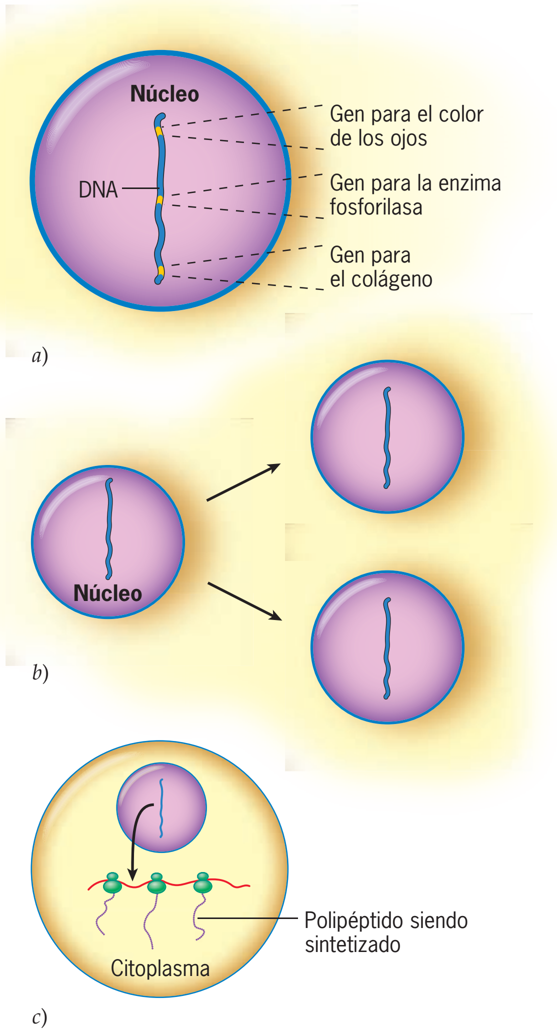



**FIGURA 10-12 Tres funciones requeridas del material genético.** *a*) El DNA debe contener la información que codifica los rasgos hereditarios. *b*) El DNA debe contener la información que dirige su propia duplicación. *c*) El DNA debe contener la información que dirige el ensamblaje de proteínas específicas.

capítulo, pasaría otra década antes de que los biólogos pudieran aprender el mecanismo por el cual una secuencia de aminoácidos está codificada por una secuencia de nucleótidos de DNA.

En cuanto a la segunda función, la publicación inicial de Watson y Crick de la estructura del DNA incluía una propuesta sobre cómo dicha molécula podría replicarse. Esta pudo haber sido la primera vez que un estudio de estructura molecular condujo de forma directa a una hipótesis sobre un mecanismo molecular básico. Watson y Crick plantearon que durante la replicación, los enlaces de hidrógeno que contienen las dos cadenas de la hélice de DNA se rompen de manera secuencial, causando la separación gradual de las cadenas, de forma parecida a la separación de dos mitades de una cremallera. Cada una de las cadenas separadas, con sus bases nitrogenadas expuestas, servirían entonces como una *plantilla* que dirige el orden, en el cual los nucleótidos complementarios se ensamblan para formar la cadena complementaria. Una vez completo, el proceso generaría dos moléculas de DNA de cadena doble que son 1) idénticas entre sí, y 2) idénticas a la molécula del DNA original. De acuerdo con la propuesta de Watson-Crick, cada doble hélice del DNA contendría una cadena de la molécula de DNA original y una recién sintetizada (véase figura 13-1). Como se analizará en el capítulo 13, la propuesta de Watson-Crick fue bastante buena para predecir el mecanismo de replicación del DNA. De las tres funciones principales enumeradas con anterioridad, sólo el mecanismo por el cual el DNA rige el ensamblaje de una proteína específica se mantuvo en un misterio total.

No sólo fue importante la elucidación de la estructura del DNA por derecho propio, también lo fue el que se estimulara la investigación de todas las actividades en las que debía participar el material genético. Una vez que el modelo para su estructura fue aceptado, cualquier teoría acerca de un código genético, síntesis de DNA o transferencia de información tenía que ser coherente con esa estructura.

**REPASO**

1. ¿Qué se entiende al decir que una cadena de DNA tiene polaridad, que las dos cadenas son antiparalelas, que la molécula tiene un surco mayor y un surco menor, que las cadenas son complementarias unas con otras?
2. ¿Cuál es la relación entre el análisis de Chargaff de la composición de base del DNA y la estructura de la doble hélice?

# 10.6 VÍAS EXPERIMENTALES

## Naturaleza química del gen

Tres años después de que Gregor Mendel presentara los resultados de su trabajo sobre la herencia en las plantas de guisantes, Friedrich Miescher se graduó de una escuela de medicina suiza y viajó a Tübingen, Alemania, a pasar un año estudiando con Ernst Hoppe-Seyler, quien fuera uno de los mejores químicos (y posiblemente el primer bioquímico) del periodo. Miescher estaba interesado en el contenido químico del núcleo celular. Para aislar el material de los núcleos celulares con un mínimo de contaminación de los componentes citoplasmáticos, Miescher necesitaba células que tuvieran núcleos grandes y fueran fáciles de obtener en cantidad. Eligió a los glóbulos blancos, que obtuvo del pus de vendas quirúrgicas tiradas por una clínica local. Miescher trató las células con ácido clorhídrico diluido, al que agregó un extracto del estómago de cerdo que eliminó las proteínas (el extracto de estómago contenía la enzima proteolítica pepsina). El residuo de este tratamiento estaba compuesto, principalmente, de núcleos de células aisladas que se depositaron en el fondo del vaso. Miescher luego extrajo los núcleos con álcali diluido. El material soluble en álcali se purificó aún más por precipitación con ácido diluido y reextracción con álcali diluido. Miescher descubrió que el extracto alcalino contenía una sustancia que tenía propiedades diferentes a las descubiertas previamente: la molécula era muy grande, ácida y rica en fósforo. Denominaron al material “nucleína”. Un año después, Miescher regresó a su casa en Suiza, mientras que Hoppe-Seyler, quien era cauteloso sobre los hallazgos, repitió el trabajo. Con los resultados confirmados, Miescher publicó el descubrimiento en 1871.[1]

De vuelta en Suiza, Miescher continuó sus estudios sobre la química del núcleo celular. Como vivía cerca del río Rin, Miescher tenía acceso fácil al salmón que había nadado aguas arriba y

(*continúa*)

que estaba maduro con huevos o esperma. Los espermatozoides fueron las células ideales para estudiar los núcleos. Al igual que los glóbulos blancos, podrían obtenerse en grandes cantidades y 90% de su volumen estaba ocupado por núcleos. Las preparaciones de nucleína de Miescher a partir de células de esperma contenían un mayor porcentaje de fósforo (casi 10% por peso) que las de los glóbulos blancos, lo que indicaba que tenían menos proteínas contaminantes. De hecho, fueron las primeras preparaciones de DNA relativamente puras. El término ácido nucleico fue acuñado en 1889 por Richard Altmann, uno de los estudiantes de Miescher, que resolvió los métodos de purificación de DNA libre de proteínas de varios tejidos de animales y levadura.[2]

Durante las últimas dos décadas del siglo XIX, numerosos biólogos se centraron en los cromosomas y describieron su comportamiento durante y entre la división celular (sección 10.2). Una forma de observar los cromosomas era manchar estas estructuras celulares con tintes. Un botánico llamado E. Zacharias descubrió que las mismas tinciones que hacían visibles a los cromosomas, también teñían una preparación de nucleína que se había extraído utilizando el procedimiento de Miescher de la digestión con pepsina en un medio de HCl. Además, cuando las células extraídas con pepsina-HCl se extrajeron posteriormente con álcali diluido, un procedimiento conocido por eliminar la nucleína, el residuo celular (que incluía los restos cromosómicos) ya no contenía material que se pudiera teñir. Estos y otros resultados apuntaron con fuerza a la nucleína como un componente de los cromosomas. En una propuesta de una clarividencia notable, Otto Hertwig, quien había estado estudiando el comportamiento de los cromosomas durante la fertilización, declaró en 1884: "Creo que con lo que he hecho, al menos es muy probable que la nucleína sea la sustancia responsable, no sólo de la fertilización, sino también de la transmisión de las características hereditarias."[3] Irónicamente, a medida que se aprendía más sobre las propiedades de la nucleína, menos se consideraba como un candidato para el material genético.

Durante los 50 años que siguieron al descubrimiento de Miescher del DNA, se describieron la química de la molécula y la naturaleza de sus componentes. Algunas de las contribuciones más importantes en esta búsqueda fueron hechas por Phoebus Aaron Levene, quien emigró de Rusia a Estados Unidos en 1891, para establecerse eventualmente en un puesto en el Instituto Rockefeller de Nueva York. Fue Levene quien, finalmente, resolvió uno de los problemas más resistentes de la química del DNA, cuando determinó en 1929 que el azúcar de los nucleótidos era 2-desoxirribosa.[4] Para aislar el azúcar, Levene y E. S. London colocaron el DNA en el estómago de un perro a través de una abertura quirúrgica, y luego recogieron la muestra del intestino del animal. A medida que pasaba por el estómago e intestino, varias enzimas del tracto digestivo del animal actuaron sobre el DNA, separando los nucleótidos en sus partes componentes, las que pudieron ser aisladas y analizadas. Levene resumió el estado del conocimiento sobre los ácidos nucleicos en una monografía publicada en 1931.[5]

Mientras Levene recibió el crédito por su trabajo en la determinación de la estructura de los componentes del DNA, también se le atribuyó haber sido el principal obstáculo en la búsqueda de la naturaleza química del gen. A lo largo de este periodo, se hizo cada vez más evidente que las proteínas eran muy complejas y exhibían una gran especificidad para catalizar una notable variedad de reacciones químicas.

Por otro lado, se pensó que el DNA estaba compuesto por una repetición monótona de sus cuatro bloques de construcción de nucleótidos. El principal defensor de esta visión del DNA, que se llamó teoría tetranucleótido, fue Phoebus Levene. Debido a que los cromosomas consisten en sólo dos componentes, DNA y proteína, existía poca duda en ese momento acerca de que la proteína era material genético.

Mientras se resolvía la estructura del DNA, una línea de investigación aparentemente independiente se estaba llevando a cabo en el campo de la bacteriología. Durante la década de 1920, se descubrió que varias especies de bacterias patógenas

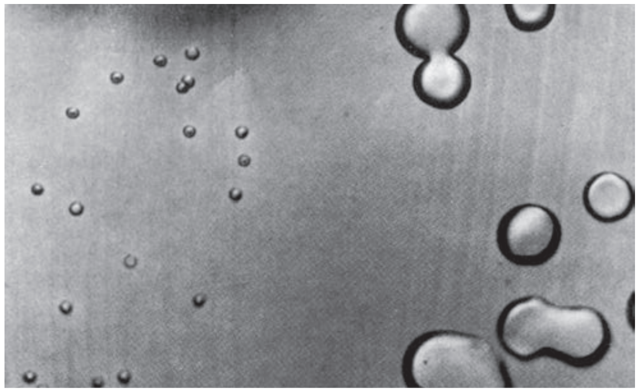


**FIGURA 1 Las grandes colonias brillantes a la derecha son neumococos tipo S virulentos, mientras que las colonias más pequeñas de la izquierda son neumococos tipo R no virulentos.** Como se analiza a continuación, las células en estas colonias S particulares son el resultado de la transformación de bacterias R por DNA a partir de neumococos S muertos por el calor.

FUENTE: Tomada de OT Avery, CM Macleod y M Mccarty, *J Exp Medicina* 1944;79:153. Reproducida con permiso de The Rockefeller University Press.

podían cultivarse en laboratorio de dos formas diferentes. Las bacterias virulentas, es decir, células bacterianas capaces de causar enfermedades, crearon colonias lisas, con forma de domo y regulares. Por el contrario, las células bacterianas no virulentas crecieron en colonias rugosas, planas e irregulares (**FIGURA 1**).[6] El microbiólogo británico J. A. Arkwright presentó los términos suave (S, *smooth*) y rugoso (R, *rough*) para describir estos dos tipos. Bajo el microscopio, se observó que las células que formaban colonias S estaban rodeadas por una cápsula gelatinosa, mientras que la cápsula estaba ausente de las células en las colonias R. La cápsula bacteriana ayuda a proteger una bacteria de las defensas de su anfitrión, lo que explica por qué las células R, que carecían de estas estructuras, no pudieron causar infecciones en los animales de laboratorio.

Debido a su impacto generalizado en la salud humana, la bacteria responsable de causar neumonía (*Streptococcus pneumoniae*, o simplemente neumococo) ha sido durante mucho tiempo un foco de atención entre los microbiólogos. En 1923, Frederick Griffith, un funcionario médico del Ministerio de Salud británico, demostró que el neumococo también crecía como colonias S o R y, además, que las dos formas eran interconvertibles, es decir, en ocasiones una bacteria R podría volverse una forma S, o viceversa.[7] Griffith encontró, por ejemplo, que si inyectaba cantidades excepcionalmente grandes de bacterias R en un ratón, el animal desarrollaba con frecuencia neumonía y producía bacterias que formaron colonias de la forma S.

Se había demostrado antes que el neumococo aparecía de varios tipos (tipos I, II y III) que podrían distinguirse el uno del otro inmunológicamente. En otras palabras, se podían obtener anticuerpos de animales infectados que reaccionarían con sólo uno de los tres tipos. Por otra parte, una bacteria de un tipo nunca dio lugar a células de otro tipo. Cada uno de los tres tipos de neumococos podrían aparecer como la forma R o S.

En 1928, Griffith hizo un descubrimiento sorprendente mientras inyectaba varias preparaciones bacterianas en ratones. Las inyecciones de grandes cantidades de bacterias S muertas por calor o pequeñas cantidades de bacterias vivas R, por sí solas, eran inofensivas para el ratón. Sin embargo, al inyectar ambas preparaciones juntas en el mismo ratón, este contrajo neumonía y murió. Las bacterias virulentas podían aislarse del ratón y cultivarse. Para extender los descubrimientos, inyectó combinaciones de bacterias de diferentes tipos (**FIGURA 2**). En un inicio, ocho ratones fueron inyectados con bacterias S tipo I muertas por calor, junto con una pequeña inoculación de una cepa R viva, tipo II. Dos de los ocho animales contrajeron neumonía, y Griffith

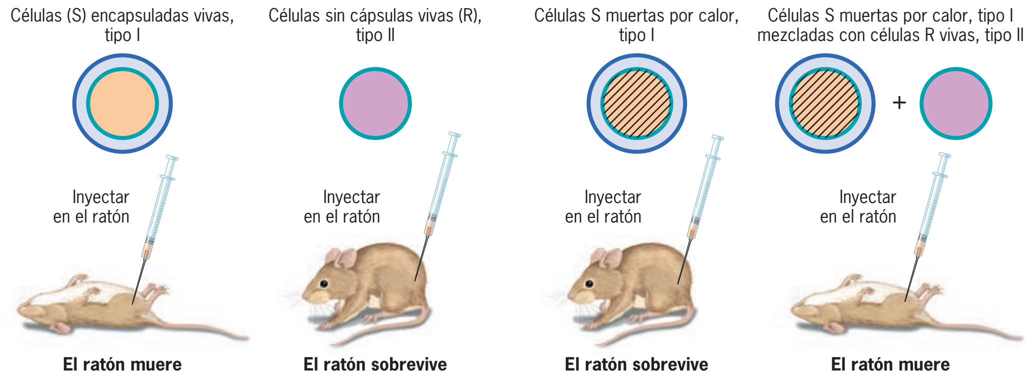



**FIGURA 2** Esquema del experimento de Griffith sobre el descubrimiento de la transformación bacteriana.

fue capaz de aislar y cultivar células bacterianas virulentas S tipo I, de los ratones infectados. Debido a que no había posibilidad de que las bacterias muertas hubiesen vuelto a vivir, Griffith concluyó que las células muertas de tipo I habían proporcionado algo a las células vivas de tipo II, no encapsuladas, que las *transformaron* en una forma encapsulada de tipo I. Las bacterias transformadas continuaron produciendo células tipo I mientras crecían en un cultivo, por tanto, el cambio fue estable y permanente.

El descubrimiento de la transformación por parte de Griffith fue confirmado con rapidez por varios laboratorios en todo el mundo, incluido el de Oswald Avery, un inmunólogo del Instituto Rockefeller, la misma institución donde Levene estaba trabajando. Avery se había mostrado, inicialmente, escéptico ante la idea de que una sustancia liberada por una célula muerta pudiera alterar la apariencia de una célula viva, pero se convenció cuando Martin Dawson, un joven asociado en su laboratorio, confirmó los resultados. Dawson pasó a demostrar que esa transformación no necesitaba ocurrir dentro de un animal vivo anfitrión. Un extracto crudo de las bacterias S muertas, mezclado en un cultivo bacteriano con un pequeño número de células no virulentas (R) en presencia de suero anti-R, fue capaz de convertir las células R en la forma S virulenta. Las células transformadas siempre eran del tipo característico de las células S muertas (I, II o III).[10]

El siguiente gran paso lo dio J. Lionel Alloway, otro miembro del laboratorio de Avery, quien fue capaz de solubilizar el agente transformante. Esto se logró congelando y descongelando rápidamente células muertas del donante, luego se calentaron las células rotas, se centrifugó la suspensión y se forzó el sobrenadante a través de un filtro de porcelana cuyos poros bloquearon el paso de bacterias. El extracto soluble filtrado tenía la misma capacidad de transformación que las células originales destruidas por el calor.[11]

Durante la próxima década, Avery y sus colegas centraron su atención en la purificación de la sustancia responsable de la transformación y la determinación de su identidad. Tan sorprendente como puede parecer hoy, ningún otro laboratorio en el mundo estaba persiguiendo la identidad del "principio transformante", como lo llamó Avery. El progreso en este problema fue lento.[12] Eventualmente, Avery y sus compañeros de trabajo, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, lograron aislar una sustancia del extracto soluble que de forma activa causó la transformación estando presente en sólo una parte por 600 millones. Toda la evidencia sugirió que la sustancia activa era el DNA: 1) exhibía una serie de propiedades químicas que eran características del DNA, 2) ningún otro tipo de material pudo ser detectado en la preparación, y 3) las pruebas con varias enzimas indicaron que sólo las enzimas que digirieron el DNA inactivaron el principio transformante.

El artículo publicado en 1944 fue escrito con escrupulosa precaución, y en este no se hicieron afirmaciones grandilocuentes de que los genes estuvieran hechos de DNA en lugar de proteínas.[13] El documento atrajo notablemente poca atención. Maclyn McCarty, uno de los tres autores, describió un incidente en 1949, cuando se le pidió que hablara en la Universidad Johns Hopkins, junto con Leslie Gay, quien había estado probando los efectos del nuevo fármaco Dramamine para el tratamiento de la enfermedad del mar. El gran salón estaba lleno de personas, y "después de un corto periodo de tiempo de preguntas y discusión luego de la disertación [de Gay], el presidente de la Sociedad se levantó para presentarme como el segundo orador. Muy poco de lo que dijo se pudo escuchar, debido al ruido creado por las personas al salir de la sala de conferencias. Cuando el éxodo se completó, después de haber dado los primeros minutos de mi charla, conté alrededor de treinta y cinco almas resistentes que habían permanecido en la audiencia, porque querían saber sobre la transformación del neumococo o porque sentían que tenían que permanecer por cortesía." Pero la conciencia de Avery sobre el potencial de su descubrimiento se reveló en una carta que escribió en 1943 a su hermano Roy, quien fuera también bacteriólogo:

> Si tenemos razón, y por supuesto eso aún no está probado, entonces significa que los ácidos nucleicos no son meramente importantes desde el punto de vista estructural, sino sustancias activas funcionalmente en la determinación de las actividades bioquímicas y características específicas de las células, y eso a través de una sustancia química conocida, por la cual es posible inducir cambios predecibles y hereditarios en las células. Esto es algo que ha sido durante mucho tiempo el sueño de los genetistas... Se asemeja a un virus, quizás es un gen. Pero con los mecanismos no estoy ahora preocupado, un paso a la vez... Por supuesto, el problema está plagado de implicaciones... Toca a la genética, a la química enzimática, al metabolismo celular y a la síntesis de carbohidratos, etc. Pero hoy se necesita mucha evidencia bien documentada para convencer a cualquier persona de que la sal de sodio del ácido desoxirribonucleico, libre de proteínas, posiblemente podría estar dotada con tales propiedades biológicamente activas y específicas, y esa evidencia estamos ahora tratando de obtenerla. Es muy divertido romper burbujas, pero es más prudente pincharlas usted mismo antes de que alguien más lo intente.

Muchos artículos y pasajes en libros han tratado sobre razones por las cuales los hallazgos de Avery no fueron recibidos con mayor aclamación. Parte de la razón puede deberse a la manera modesta en que el trabajo fue escrito y el hecho de que Avery era un bacteriólogo, no un genetista. Algunos biólogos se convencieron de que la preparación de Avery pudo haber sido contaminada con cantidades minúsculas de proteína y que el contaminante, no el DNA, era el agente transformante activo. Otros cuestionaron si los estudios sobre la transformación en bacterias tenían alguna relevancia para el campo de la genética.

(*continúa*)

Durante los años posteriores a la publicación del artículo de Avery, el clima en genética cambió de una manera importante. Se reconoció la existencia del cromosoma bacteriano, y una serie de prominentes genetistas dirigieron su atención a estos procariotas. Estos científicos creían que el conocimiento obtenido de los estudios de los organismos celulares más simples arrojaría luz sobre los mecanismos que operan en las plantas y animales más complejos. Además, el trabajo de Erwin Chargaff sobre la composición de base del DNA destrozó la idea de que el DNA era una molécula que consistía en una serie repetitiva simple de nucleótidos (discutido en la sección 10.6).[14] Este hallazgo despertó en los investigadores la posibilidad de que el DNA pudiera tener las propiedades necesarias para cumplir una función en el almacenamiento de la información.

Siete años después de la publicación del artículo de Avery sobre la transformación de bacterias, Alfred Hershey y Martha Chase, de los Laboratorios Spring Harbor, en Nueva York, volvieron su atención a un sistema aún más simple: los bacteriófagos o virus que infectan a las células bacterianas. En 1950, los investigadores reconocieron que los virus también tenían un programa genético. Los virus inyectaban su material genético en la bacteria huésped, donde dirigían la formación de nuevas partículas de virus dentro de la célula infectada. En cuestión de minutos, la célula infectada se rompía, liberando nuevas partículas de bacteriófago, que luego infectaban a las células huésped vecinas.

Estaba claro que el material genético que dirige la formación de la progenie viral tenía que ser DNA o proteína, porque estas eran las únicas dos moléculas contenidas en el virus. Las observaciones en el microscopio electrónico mostraron que, durante la infección, la mayor parte del bacteriófago permanece fuera de la célula, unido a la superficie de la célula por las fibras de la cola (**FIGURA 3**). Hershey y Chase razonaron que el material genético del virus debía poseer dos propiedades. La primera, si el material era para dirigir el desarrollo de nuevos bacteriófagos durante la infección, debe pasar a la célula infectada. La segunda, si el material lleva información heredada, debe transmitirse a la nueva generación de bacteriófagos. Hershey y Chase prepararon dos tandas de bacteriófagos que usar para la infección (**FIGURA 4**). Un lote contenía DNA marcado de forma radiactiva ([$^{32}$P]DNA); el otro lote contenía proteína marcada de manera radiactiva (proteína[$^{35}$S]). Debido a que el DNA carece de átomos de azufre (S, ***sulfur***) y la proteína generalmente carece de átomos de fósforo (P, ***phosphorus***), estos dos radioisótopos proporcionaron etiquetas distintivas para los dos tipos de macromoléculas. Su plan experimental era permitirle a uno u otro tipo de bacteriófago infectar una población de células bacterianas, esperar unos minutos y luego quitar los virus vacíos de las superficies de las células. Después de probar varios métodos para separar las bacterias del fago unido a la cubierta, descubrieron que esto se lograba mejor sometiendo la suspensión infectada a las cuchillas giratorias de una licuadora Waring. Una vez que las partículas de virus se habían separado de las células, las bacterias podrían centrifugarse en el fondo del tubo, dejando las cubiertas virales vacías en suspensión.

Al seguir este procedimiento, Hershey y Chase determinaron la cantidad de radiactividad que ingresó a las células *versus* la cantidad que quedó atrás en las cubiertas vacías. Encontraron que, cuando las células se infectaron con bacteriófagos marcados con proteínas, la mayor parte de la radiactividad permaneció en las cubiertas vacías. Por el contrario, cuando las células se infectaron con bacteriófagos marcados con el DNA, la mayor parte de la radiactividad pasó hacia dentro de la célula huésped. Cuando monitorearon la radiactividad que pasó a la siguiente generación, hallaron que menos de 1% de los etiquetados con la proteína podía detectarse en la progenie, mientras que aproximadamente 30% del DNA etiquetado podía encontrarse en la próxima generación.

La publicación de los experimentos de Hershey-Chase en 1952,[15] junto con el abandono de la teoría de los tetranucleótidos, eliminó cualquier obstáculo restante a la aceptación del DNA como el material genético. De repente, se generó un gran nuevo interés en una molécula que había sido ignorada en gran medida. Se estableció el escenario para el descubrimiento de la doble hélice.

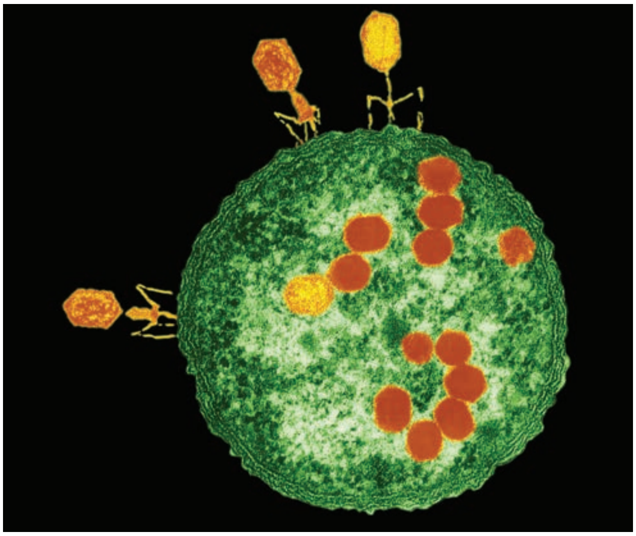


**FIGURA 3 Micrografía electrónica de una célula bacteriana infectada por bacteriófago T4.** Cada fago se ve unido por sus fibras de la cola a la superficie externa de la bacteria, mientras que las nuevas cabezas de fagos están siendo ensambladas en el citoplasma de la célula huésped. FUENTE: Lee D. Simon/Photo Researchers, Inc.

## Referencias


1. Miescher J. F. *Hoppe-Seyler's Med Chem Untersuchungen* 1871;4:441.
2. Altmann R. *Anat u Physiol, Physiol* 1889;Abt. 524.
3. Tomado de Mirsky A. E. The discovery of DNA. *Sci Am* 1968 Jun;218:78-88.
4. Levene P. A., London E. S. The structure of thymonucleic acid. *J Biol Chem* 1929;83:793-802.
5. Levene PA, Bass LW. Nucleic Acids. The Chemical Catalog Co.; 1931.
6. Arkwright J. A. Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *J Path Bact* 1921;24:36-60.
7. Griffith F. The influence of immune serum on the biological properties of pneumococci. *Rep Public Health Med Subj* 1923;18:1-13.
8. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hygiene* 1928;27:113-159.
9. Dawson M. H. The transformation of pneumoccal types. *J Exp Med* 1930;51:123-147.
10. Dawson M. H., Sia RHP. *In vitro* transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 1931;54:701-710.
11. Alloway J. L. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by use of filtered pneumococcus extracts. *J Exp Med* 1932;55:91-99.
12. McCarty M. *The Transforming Principle: Discovering That Genes Are Made of DNA*. Norton; 1985.
13. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 1944;79:137-158.
14. Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experentia* 1950; 6:201-209.
15. Hershey A. D., Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952;36:39-56.

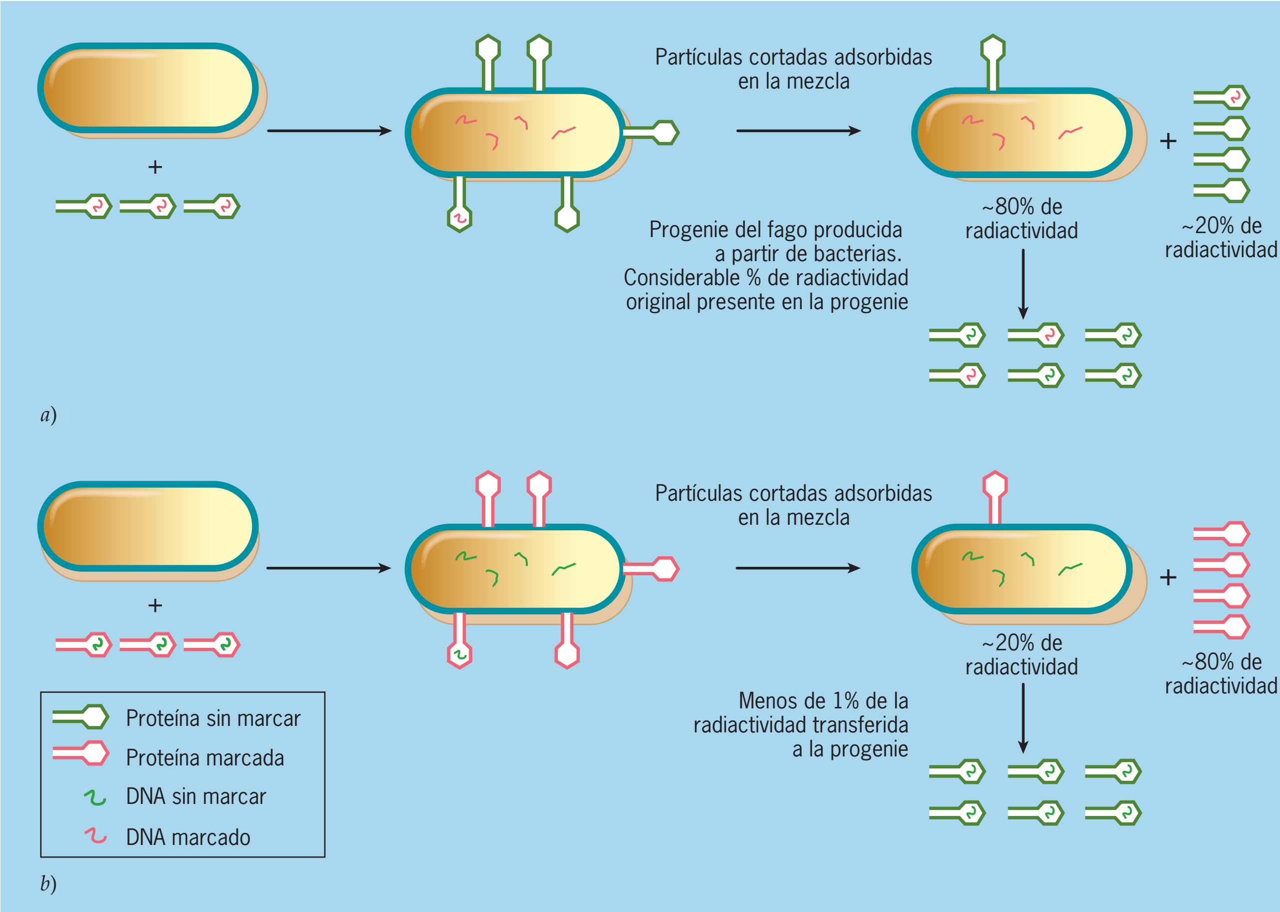



**FIGURA 4** Experimento de Hershey-Chase que muestra que las células bacterianas infectadas con fagos que contienen DNA marcado con $^{32}P$ (moléculas de DNA en rojo) se marcaron radiactivamente y produjeron progenie de fagos marcada. Por el contrario, las células bacterianas infectadas con fagos que contienen proteína marcada con $^{35}S$ (capas de fagos rojas) no se marcaron radiactivamente y produjeron sólo progenie no marcada.

## 10.7 DNA superenrollado

En 1963, Jerome Vinograd y sus colegas en el Instituto de Tecnología de California descubrieron que dos moléculas de DNA circulares, cerradas, de masa molecular idéntica, podían exhibir diferentes tasas de sedimentación durante la centrifugación (sección 18.10). Análisis posteriores indicaron que la molécula de DNA que se sedimentaba más rápidamente tenía una forma más compacta, porque la molécula estaba retorcida sobre sí misma (**FIGURA 10-13*a,b***), de manera muy parecida a una banda elástica en la que los dos extremos se tuercen en direcciones opuestas o un cable de teléfono enredado después de un uso prolongado. Se dice que el DNA en este estado está **superenrollado**. Debido a que el DNA superenrollado es más compacto que su homólogo relajado, ocupa un volumen más pequeño y se mueve más rápido en respuesta a una fuerza centrífuga o a un campo eléctrico (figura 10-13*c*).

El superenrollamiento se entiende mejor si se representa una longitud de DNA doble helicoidal que descansa libre sobre una superficie plana. Una molécula en esta condición tiene el número estándar de 10 pares de bases por vuelta de la hélice y se dice que está *relajada*. El DNA aún estaría relajado, si ambos extremos de las dos cadenas simplemente se fusionaran para formar un círculo. Hay que considerar, sin embargo, qué pasaría si la molécula se torciera *antes* de que se sellaran los extremos. Si la longitud del DNA se tuerce en una dirección opuesta a aquella en la que se enrolló el dúplex, la molécula tiende a relajarse. Una molécula de DNA *menos enrollada* tiene un mayor número de pares de bases por cada vuelta de la hélice (**figura 10-14**). Debido a que la molécula es más estable con 10 residuos por vuelta, tiende a resistir la tensión de volverse menos enrollada volviéndose a torcer sobre sí misma en una conformación superenrollada (figura 10-14).

Se dice que el DNA está *superenrollado negativamente* cuando está menos enrollado y *superenrollado positivamente* cuando está más enrollado. Los DNA circulares encontrados en la naturaleza (p. ej., el mitocondrial, el viral, el bacteriano) están, de manera invariable, superenrollados negativamente. El superenrollamiento no está restringido a los DNA circulares pequeños, sino también se produce en el DNA lineal eucariota. Por ejemplo, el superenrollamiento negativo cumple una función clave, al permitirle al DNA de los cromosomas que se compacten, para que quepan dentro de los confines de un núcleo celular (sección 12.2). Debido a que el DNA superenrollado negativamente está menos enrollado, ejerce una fuerza que ayuda a separar las dos cadenas de la hélice, lo cual se requiere para la replicación (síntesis de DNA) y la transcripción (síntesis de RNA).

Las células dependen de enzimas para cambiar el estado superenrollado de un DNA dúplex. Estas enzimas se llaman **topoisomerasas,** porque cambian la *topología* del DNA. Las topoisomerasas fueron descubiertas en 1971 por James Wang, de la

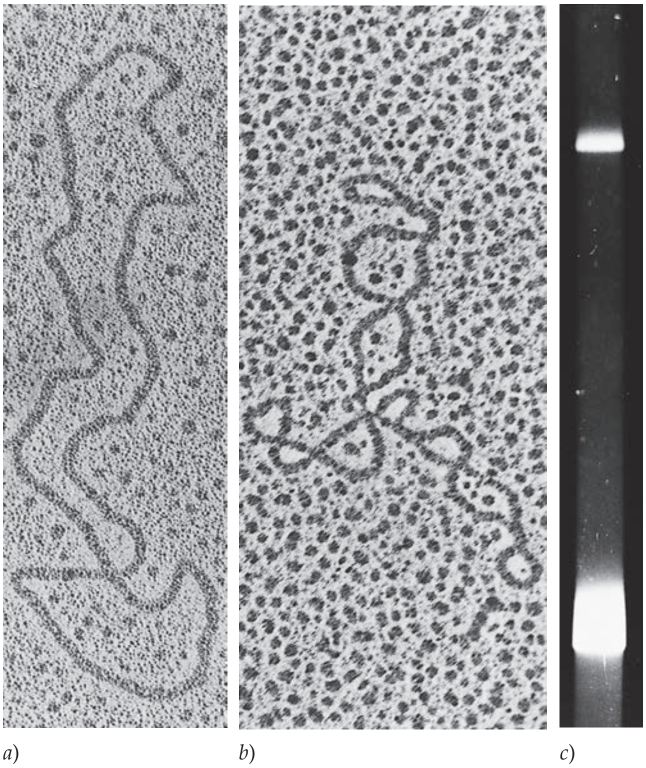



**FIGURA 10-13 DNA superenrollado.** *a*,*b*) Micrografías electrónicas que muestran las diferencias en la conformación entre una molécula circular relajada de DNA de un fago (*a*) y el mismo tipo de molécula en un estado superenrollado (*b*). c) Cuando una mezcla de moléculas de DNA SV40 relajadas y superenrolladas se somete a electroforesis en gel, la forma altamente compacta y superenrollada (vista en la parte inferior del gel) se mueve mucho más rápido que la forma relajada. Las moléculas del DNA se visualizan al teñir el gel con bromuro de etidio, una molécula fluorescente que se inserta en la doble hélice.

FUENTE: *a* y *b*) Cortesía de James C. Wang; c) De Walter Keller. *Proc Nat'l Acad Sci US* 1975;72:2553.

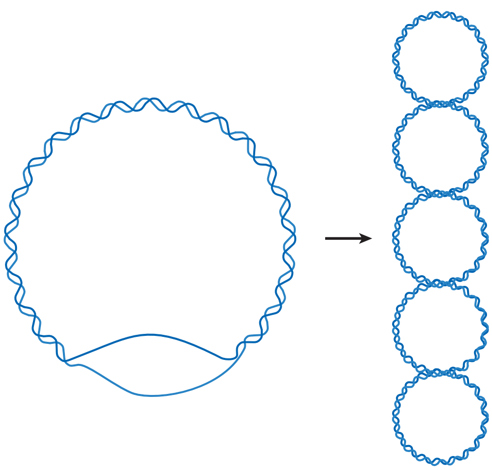


**FIGURA 10-14. DNA menos enrollado.** La molécula del DNA a la izquierda está menos enrollada, es decir, tiene más de un promedio de 10 pares de bases por cada vuelta de una hélice. Una molécula menos enrollada toma una conformación superenrollada negativa espontáneamente, como se muestra a la derecha.

Universidad de California, Berkeley. Las células contienen una variedad de topoisomerasas, que se pueden dividir en dos clases. Las *topoisomerasas tipo I* cambian el estado superenrollado de una molécula de DNA al crear una ruptura transitoria en una cadena del dúplex. En la **FIGURA 10-15*a*)** se muestra un modelo para el mecanismo de acción de la topoisomerasa I humana. La enzima escinde una cadena del DNA y luego permite que la cadena intacta, complementaria se someta a una rotación controlada, que relaja la molécula superenrollada. La topoisomerasa I es esencial para procesos como la replicación de DNA y la transcripción. Funciona en estas actividades mediante la prevención de un superenrollamiento excesivo, al formar cadenas complementarias de un DNA dúplex que se separan y desenrollan (como en la figura 13-6). Las *topoisomerasas tipo II* producen una ruptura transitoria en ambas cadenas de un DNA dúplex. Otro segmento de la molécula de DNA (o una molécula separada enteramente) luego se transporta a través de la ruptura, y las cadenas cortadas se vuelven a sellar. Como era de esperar, este complejo mecanismo de reacción se acompaña de una serie de intensos cambios de conformación que se representan en el modelo de la figura 10-15*b*). Estas enzimas son capaces de algunos "trucos" extraordinarios. Además de poder superenrollar y relajar el DNA [figura 10-15*c*), panel 1], las topoisomerasas tipo II pueden unir una molécula de DNA en nudos o desatar un nudo de DNA [figura 10-15*c*, panel 2). También pueden formar una población de DNA circulares independientes, para entrelazarse (*catenación*), o circulares entrelazados separados en componentes individuales [figura 10-15*c*)(3),*d*)]. La topoisomerasa II es necesaria para desenredar las moléculas de DNA, antes de que los cromosomas duplicados puedan separarse durante la mitosis. La topoisomerasa II humana es un objetivo para una serie de fármacos (p. ej., etopósido y doxorrubicina) que se unen a la enzima y evitan que las cadenas de DNA escindidas vuelvan a unirse. Al hacerlo, estos fármacos matan preferentemente a las células que se dividen con rapidez y, por tanto, se utilizan en el tratamiento del cáncer.

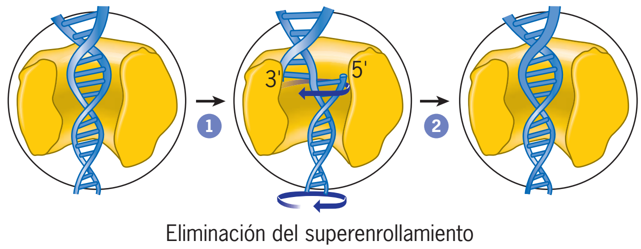
**REPASO**

1. ¿En qué difieren los DNA muy enrollados y menos enrollados? ¿En qué difieren las dos clases de topoisomerasas?

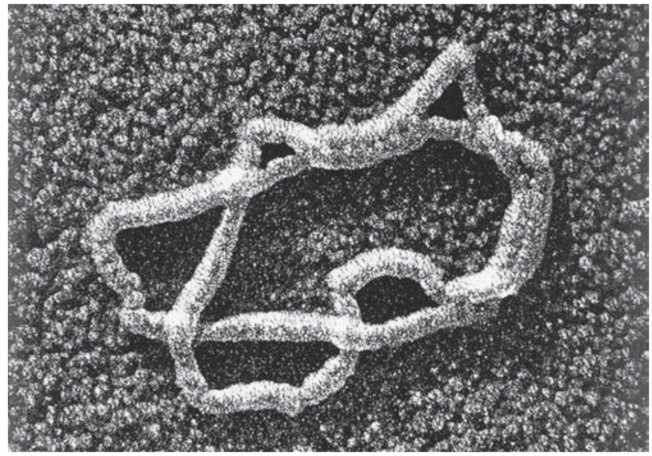
## 10.8 Complejidad del genoma

El DNA es una macromolécula, un conjunto de una gran cantidad de átomos unidos en una disposición definida, cuya estructura tridimensional se puede describir mediante técnicas tales como la cristalografía de rayos X. Pero el DNA también es un almacén de información, que es una propiedad más difícil de describir en términos moleculares simples. Como se señaló anteriormente, un gen corresponde a un segmento particular de DNA, entonces la suma de la información genética que un organismo individual hereda de sus padres es equivalente a la suma de todos los segmentos de DNA presentes en el ovocito fertilizado al comienzo de la vida. Todos los individuos que componen una población de especies comparten el mismo conjunto de genes, aunque los diferentes individuos invariablemente poseen versiones un poco diferentes (alelos) de muchos de estos genes. Por consiguiente, cada especie de organismo tiene un contenido único de información genética, que es conocido como su genoma. Para los seres humanos, el genoma es en esencia equivalente a toda la información genética que está presente en un solo conjunto de cromosomas humanos (**haploide**), que incluye 22 autosomas diferentes y los cromosomas sexuales X y Y.

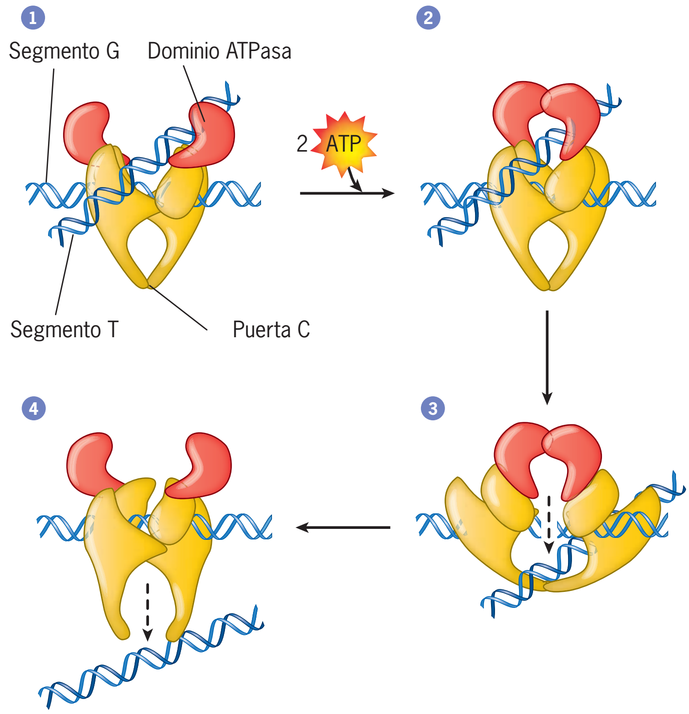
Para entender cómo se determina la complejidad del genoma, primero es necesario considerar una de las más importantes propiedades de la doble hélice de DNA: su capacidad de separarse en sus dos cadenas componentes, una propiedad denominada **desnaturalización**.



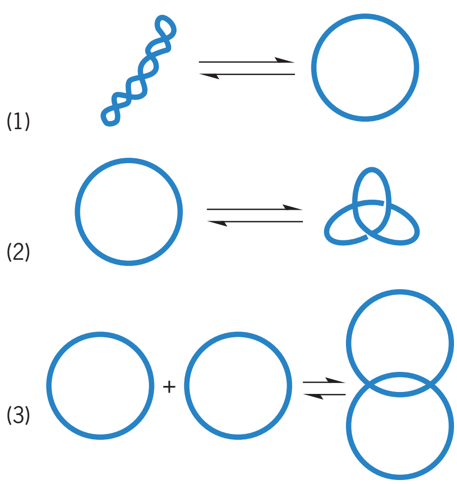

*a*)



*d*)




*b*)




*c*)

**FIGURA 10-15 Topoisomerasas del DNA.** *a*) Un modelo que representa la acción de la topoisomerasa humana I. La enzima (amarillo) corta una de las cadenas de DNA (paso 1), que gira alrededor de un enlace fosfodiéster en una cadena intacta. La cadena cortada se vuelve a sellar (paso 2). (*Nota:* El dibujo representa una topoisomerasa tipo IB; las enzimas de tipo IA que se encuentran en las bacterias actúan por un mecanismo diferente.) *b*) Un modelo molecular basado en cristalografía de rayos X que representa la acción de la topoisomerasa II, una enzima dimérica que consiste en dos mitades idénticas. En el paso 1, la enzima se ha unido al segmento de G-DNA, llamado así porque formará la puerta a través de la cual el segmento de T-DNA (o DNA transportado) pasará. En el paso 2, la enzima dimérica hidroliza dos moléculas de ATP y experimenta un cambio de conformación, debido a que los dos dominios ATPasa se cierran. En el paso 3, el segmento G se divide, y el segmento T pasa a través de la "puerta" abierta. En esta etapa, los extremos cortados del segmento G están unidos covalentemente a la enzima. En el paso 4, se vuelven a unir los dos extremos del segmento G, y el segmento T sale por la puerta C. *c*) Tipos de reacciones que son catalizadas por las topoisomerasas. La parte 1 muestra las reacciones de superenrollamiento y relajación; la parte 2 muestra las reacciones de anudamiento-desanudamiento; la parte 3 muestra las reacciones de catenación. *d*) Micrografía electrónica de un par de moléculas de DNA circular interconectadas (catenadas). Moléculas de este tipo se obtienen de bacterias que carecen de una topoisomerasa específica.

FUENTE: *a*) Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd: DA Koster, *et al*. *Nature* 2005;434:671; Copyright 2005. *b*) Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd: JM Berger, *et al*. *Nature* 1996;388:231; derechos de autor 1997.; *d*) Tomado de N. Cozarrelli. *Cell* 1992*;* vol. 71, cubierta #2, con el permiso de Elsevier.

## Desnaturalización del DNA

Como sugirieron por primera vez Watson y Crick, las dos cadenas de la molécula de DNA se mantienen unidas por enlaces no covalentes débiles. Cuando el DNA se disuelve en solución salina y la solución se calienta lentamente, la temperatura de desnaturalización es alcanzada cuando comienza la separación de las cadenas. El proceso por lo general se completa en unos pocos grados y la solución contiene moléculas de cadena simple que están separadas por completo de sus compañeras originales. El progreso de desnaturalización térmica (o *fusión del DNA*) usualmente se controla siguiendo el aumento en la absorbancia de la luz ultravioleta por el DNA disuelto. Una vez que las dos cadenas DNA se han separado, las interacciones hidrofóbicas que resultan del api-

lamiento de bases se reducen en gran medida, lo que cambia la naturaleza eléctrica de las bases y aumenta su absorbancia de radiación ultravioleta. El aumento de la absorbancia que acompaña la desnaturalización del DNA se muestra en la **FIGURA 10-16**. La temperatura a la cual el cambio en la absorbancia ha llegado a la mitad se denomina *temperatura de fusión* ($T_m$, *melting temperature*). Cuanto mayor sea el contenido de GC (%G + %C) del DNA, mayor será la T*m*. Esta mayor estabilidad del DNA que contiene GC refleja la presencia del enlace de hidrógeno adicional entre las bases en comparación con los pares AT (figura 10-11*c*).

## Renaturalización del DNA

La separación de las dos cadenas del DNA dúplex por calor no es un hallazgo inesperado, pero la *reasociación* de cadenas únicas en moléculas estables de doble cadena con pares de bases correctos es casi inconcebible. Sin embargo, en 1960, Julius Marmur y Paul Doty, en la Universidad de Harvard, descubrieron que si enfriaban lentamente una solución de DNA bacteriano, el cual había sido desnaturalizado de forma térmica, el DNA recuperaba las propiedades de la doble hélice, absorbía menos la luz ultravioleta y se comportaba, una vez más, como material genético, al ser capaz de transformar células bacterianas (discutido en la sección 10.6). A partir de este estudio, se puso de manifiesto que las moléculas de DNA monocatenario complementarias eran capaces de reasociarse, un evento denominado **renaturalización** o **reasociación**. Este hallazgo demostró ser una de las observaciones más valiosas jamás hechas en la biología molecular. Por un lado, la reasociación ha servido de base para la investigación sobre la complejidad del genoma, un tema que se aborda en las siguientes secciones. Por otro lado, la reasociación ha llevado al desarrollo de una metodología llamada *hibridación de ácido nucleico*, en la que cadenas complementarias de ácidos nucleicos de diferentes fuentes pueden mezclarse para formar moléculas de doble cadenas (híbridas). Ejemplos de los tipos de preguntas que se han respondido al permitir que los ácidos nucleicos de cadena única se hibriden se discuten más adelante en el capítulo y se ilustran en la figura 10-20. La hibridación de ácido nucleico desempeña una función clave en la biotecnología moderna más importante, que incluye la secuenciación, clonación y amplificación del DNA.

Estudiar la velocidad a la cual los genomas de diferentes organismos se reasocian ha proporcionado una idea de los tipos de secuencias que existen dentro de estos genomas. La renaturalización de fragmentos de DNA viral y bacteriano se produce a lo largo de curvas simétricas únicas (**FIGURA 10-17**), lo que sugiere que estos genomas simples consisten principalmente en genes dispuestos a lo largo de una matriz lineal. Por el contrario, cuando fragmentos de DNA de las plantas y los animales se pueden reasociar, la curva por lo común muestra tres pasos más o menos distintos (**FIGURA 10-18**), que corresponden a la reasociación de tres amplias clases de secuencias de DNA. Las tres clases se reasocian a diferentes velocidades, porque difieren en cuanto al número de veces que su secuencia de nucleótidos se repite dentro de la población de fragmentos. Las tres clases se denominan **fracción altamente repetida**, **fracción moderadamente repetida y fracción no repetida**.

**SECUENCIAS DE DNA ALTAMENTE REPETIDAS** Las fracciones altamente repetidas (también llamadas **repeticiones en tándem**) constituyen, en cualquier sitio, aproximadamente de 1 a 10% del DNA total. Estas secuencias son, por lo general, cortas (unos pocos cientos de nucleótidos en su punto más largo) y se presentan en grupos en los que la secuencia dada se repite una y otra vez sin interrupción. Una secuencia dispuesta de esta forma de extremo a extremo se dice que está presente *en tándem*. Las secuencias altamente repetidas se dividen en varias categorías superpuestas, entre las que se incluyen los DNA satélites, los DNA minisatélites y los DNA microsatélites.

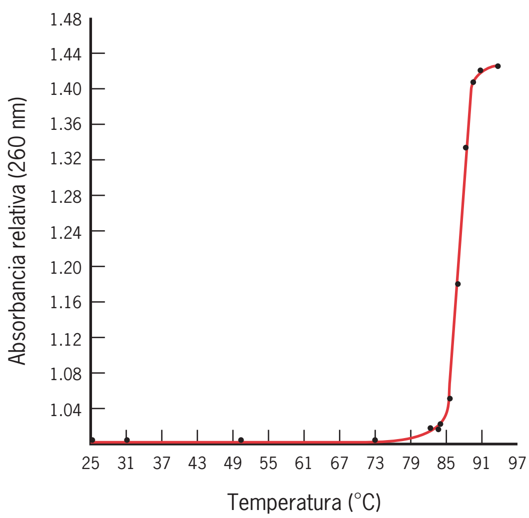



**FIGURA 10-16 Desnaturalización térmica del DNA.** Curva de desnaturalización térmica del DNA de bacteriófago T6 nativo en 0.3 M de citrato de sodio. La "fusión" del DNA (separación de cadenas) se produce en un estrecho rango de temperatura, particularmente para los DNA más simples de virus pequeños. La temperatura correspondiente a la mitad del aumento en la absorbancia se denomina $T_m$.

FUENTE: J. Marmur y P. Doty, *Journal Molecular Biology* 1961;3:593; copyright 1961. Journal of Molecular Biology por Academic Press. Reproducido con permiso de Academic Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Centro de Autorización de Derechos de Autor.

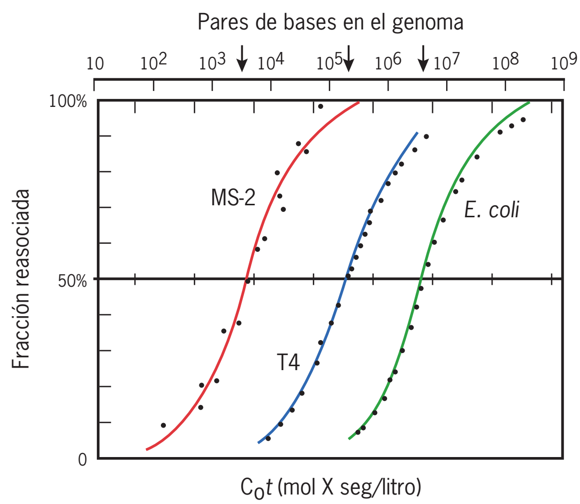



**FIGURA 10-17 La cinética de la renaturalización del DNA viral y bacteriano.** Las curvas muestran la renaturalización de cadenas de DNA cortadas de dos virus (MS-2 y T4) y una bacteria (*E. coli*). (La formación de DNA de doble cadena se traza contra $C_0t$, que es un término que combina dos variables: concentración inicial de DNA ($C_0$) y tiempo de incubación (*t*). Una solución que contiene una alta concentración de DNA incubado durante un corto tiempo tendrá el mismo $C_0t$ que una de baja concentración de DNA incubado para un tiempo correspondiente más largo; ambas tendrán el mismo porcentaje de DNA reasociado.) El tamaño del genoma, es decir, el número de pares de bases de nucleótidos en una copia de la información genética total del organismo, está indicado por las flechas cerca de la escala numérica superior. La forma de cada una de las curvas de renaturalización es muy simple y aparece con una sola pendiente. Sin embargo, el tiempo durante el cual ocurre la renaturalización es muy diferente y depende de la concentración de fragmentos complementarios, que a su vez depende del tamaño del genoma. Cuanto mayor es el genoma, menor es la concentración de fragmentos complementarios en la solución, y mayor es el tiempo requerido para que la renaturalización se complete.

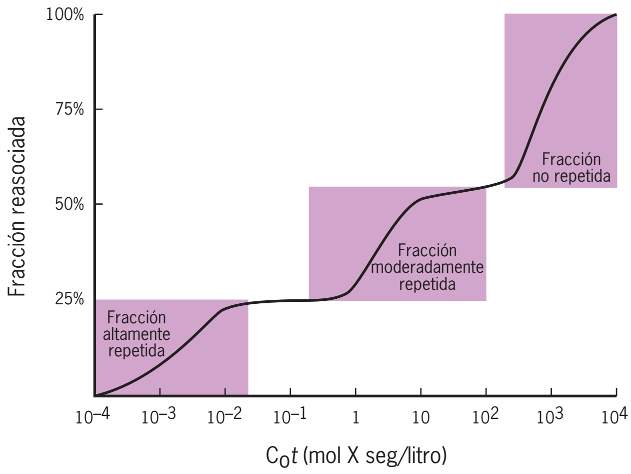



**FIGURA 10-18 Gráfica imaginaria que muestra la cinética de la renaturalización del DNA eucariota.** Cuando el DNA de cadena simple puede reasociarse, generalmente se pueden distinguir tres clases de fragmentos por su frecuencia de repetición dentro del genoma: una fracción de DNA altamente repetida, una fracción de DNA moderadamente repetida y una fracción de DNA no repetida (copia única). (*Nota:* Esta es una trama imaginaria: las tres clases de secuencias no están separadas de forma clara en una curva de renaturalización real.)

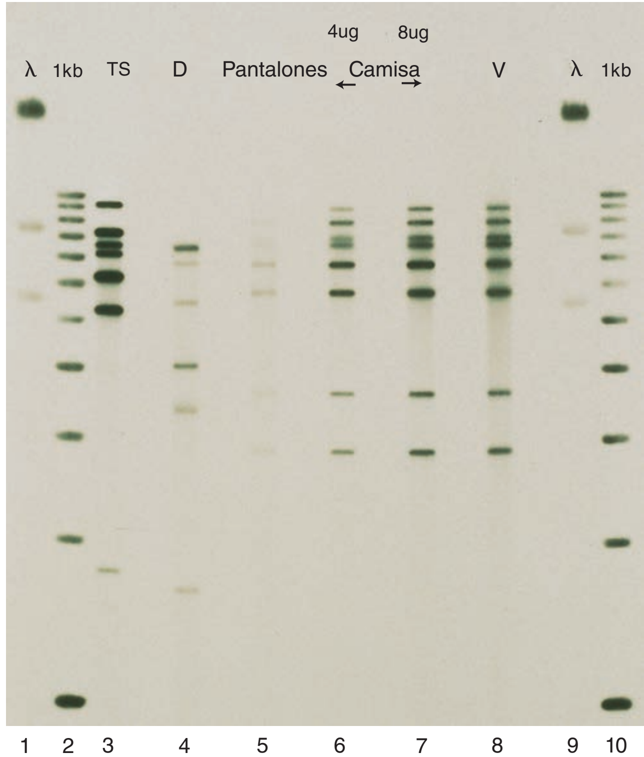



**FIGURA 10-19 Huella digital de DNA.** En esta técnica, que se usa ampliamente para identificar a un individuo a partir de una muestra de DNA, el DNA se digiere mediante tratamiento con nucleasas específicas (llamadas endonucleasas de restricción, descritas en la sección 18.20), y los fragmentos de DNA se separan en base a su longitud por electroforesis en gel. La ubicación en el gel de los fragmentos de DNA que contienen secuencias de DNA específicas se determina usando sondas marcadas con secuencias complementarias a las que se buscan. Los fragmentos de DNA que unen estas sondas tienen longitudes variables de una persona a otra, debido a la presencia de números variables de repeticiones cortas en tándem (STR, *short tandem repeats*) en el genoma. Los laboratorios forenses suelen analizar alrededor de 13 marcadores STR que se sabe que son altamente polimórficos. La posibilidad de que dos individuos tengan perfiles idénticos de STR es astronómicamente pequeña. La huella digital que se muestra en esta figura se utilizó en un caso criminal, en el que el demandado fue acusado de apuñalar y causar la muerte de una mujer joven. Las manchas de sangre en los pantalones y la camisa del acusado se compararon con los estándares de sangre conocidos de la víctima y el propio acusado. El DNA de las manchas de sangre en la ropa del acusado no coincidieron con su propia sangre estándar, pero sí con la de la víctima. Las bandas contenían DNA de las siguientes fuentes: 1, 2, 3, 9 y 10 eran muestras de DNA de control que sirven como controles de calidad; 4, sangre del acusado; 5, manchas de sangre de los pantalones del acusado; 6 y 7, manchas de sangre de la camisa del acusado; y 8, sangre de la víctima. Con el advenimiento de las técnicas de amplificación del DNA (es decir, PCR), se pueden usar muestras minúsculas del DNA para estos análisis.

FUENTE: Cortesía de Orchid Cellmark, Princeton, Nueva Jersey.

- **DNA satélites**. Los DNA satélites consisten en secuencias cortas (alrededor de cinco a unos pocos cientos de pares de bases de longitud) que forman grandes matrices lineales, cada una con hasta varios millones de pares bases de DNA. En muchas especies, la composición de la base de estos segmentos de DNA es tan diferente de la mayor parte del DNA que los fragmentos que contienen la secuencia se pueden separar en una banda "satélite" distinta durante la centrifugación en gradiente de densidad (de ahí el nombre de DNA *satélite*). Los DNA satélites tienden a evolucionar con rapidez, provocando que las secuencias de estos elementos genómicos varíen incluso entre especies estrechamente relacionadas. La localización de los DNA satélites dentro de los centrómeros de los cromosomas se describe en la figura 10-20 y con más detalles en la sección 12.5.
- **DNA minisatélites**. Las secuencias minisatélites tienen un rango de aproximadamente 10 a 100 pares de bases de longitud y se encuentran en grupos considerables que contienen hasta 3 000 repeticiones. Por tanto, las secuencias minisatélites ocupan tramos considerablemente más cortos del genoma que las secuencias satélites. Los minisatélites tienden a ser inestables, y el número de copias de una secuencia particular a menudo aumenta o disminuye de una generación a la siguiente, la mayoría probablemente como resultado de un entrecruzamiento desigual (véase figura 10-23). En consecuencia, la longitud de un *locus* minisatélite particular es muy variable en la población, incluso entre los miembros de una misma familia. Debido a que son muy variables (o *polimórficos*) en longitud, las secuencias minisatélites forman la base de la técnica de *huellas digital* de DNA, que se usa para identificar individuos en casos criminales o de paternidad (**FIGURA 10-19**).
- **DNA microsatélites**. Los microsatélites son las secuencias más cortas (1 a 9 pares de bases de longitud) y están, por lo común, presentes en pequeños grupos de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud, que están dispersos de manera bastante uniforme a través del genoma. Las enzimas que replican el DNA tienen problemas para copiar las regiones del genoma que contienen estas pequeñas secuencias repetitivas, lo que causa un alargamiento de estos tramos del DNA para cambiar de longitud a través de las generaciones. Debido a sus longitudes variables dentro de la población, los DNA microsatélites se han utilizado para analizar las relaciones entre diferentes poblaciones humanas, como se ilustra en el siguiente ejemplo. En general, se está de acuerdo en que los seres humanos modernos surgieron en África. Si esto es cierto, entonces los miembros de diferentes poblaciones africanas deberían exhibir una mayor variación en la secuencia de DNA que las poblaciones humanas que viven en otros continentes, porque los genomas de las poblaciones africanas han tenido más tiempo para divergir. El argumento para la génesis africana ha recibido el apoyo de numerosos estudios en secuencias de DNA humano. En un estudio que analizó 60 diferentes *loci* de microsatélites, se encontró que los miembros de las poblaciones africanas tenían una divergencia genética significativamente mayor que las poblaciones asiáticas o europeas. La mayoría de los *loci* de microsatélites ocurren fuera de los

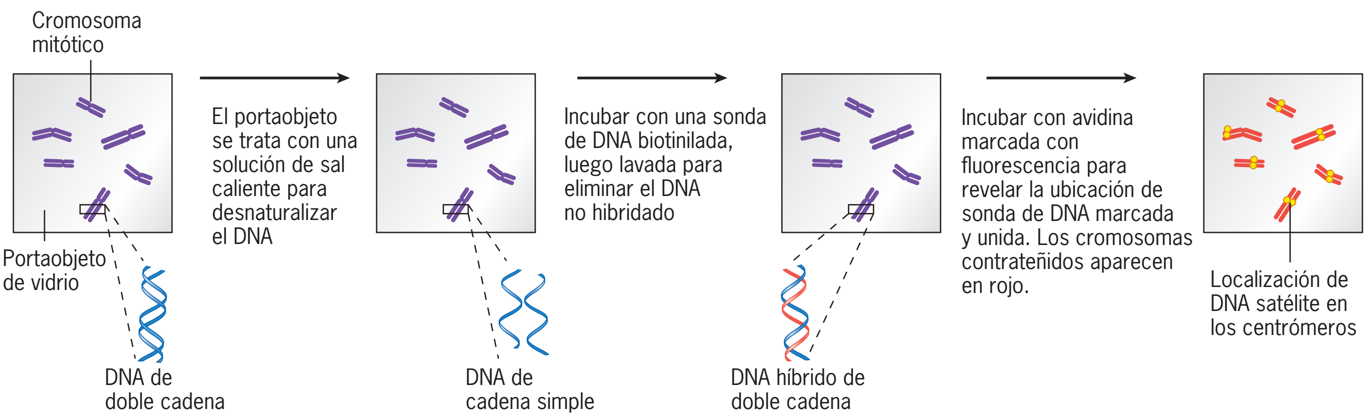
genes y los cambios en su longitud generalmente pasan desapercibidos. Este no es el caso para las secuencias de microsatélites que se discuten en el adjunto "Perspectiva Humana" (sección 10.16).

Una vez que se hizo evidente que los genomas eucarióticos contienen un gran número de copias de secuencias cortas de DNA, los investigadores trataron de averiguar dónde se encuentran estas secuencias de DNA en los cromosomas. ¿Las secuencias de DNA satélite, por ejemplo, están agrupadas en regiones particulares de un cromosoma, o se dispersan uniformemente de un extremo al otro? Se señaló anteriormente que el descubrimiento del DNA reasociado llevó al desarrollo de una vasta metodología de hibridación de ácidos nucleicos (discutida extensamente en el capítulo 18). La capacidad de localizar secuencias DNA satélite ilustra el poder analítico de la hibridación de los ácidos nucleicos.

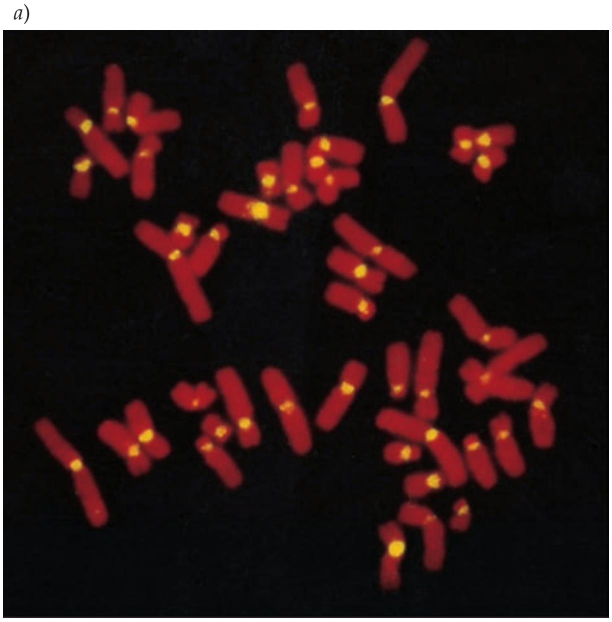
En los experimentos de reasociación descritos en la figura 10-18, se permitió que las cadenas complementarias del DNA se unieran entre sí, mientras colisionaban aleatoriamente en la solución. Un protocolo experimental alternativo llamado *hibridación in situ* fue desarrollado en 1969 por Mary Lou Pardue y Joseph Gall de la Universidad de Yale y se utilizó para determinar la ubicación del DNA satélite. El término *in situ* significa "en el lugar", lo que se refiere al hecho de que el DNA de los cromosomas se mantiene en su lugar, mientras se le permite reaccionar con una preparación particular de DNA marcado. En los primeros estudios de hibridación *in situ*, el DNA (la sonda DNA), para ser detectado, se marcó radiactivamente y se localizó por autorradiografía. La resolución de la técnica ha ido en aumento usando sondas que están marcadas con tintes fluorescentes, luego se localizan con un microscopio de fluorescencia (como en la **FIGURA 10-20*b***). Esta última técnica se llama **hibridación fluorescente *in situ* (FISH,** *fluorescence* in situ *hybridization*) y se ha refinado tanto, que puede usarse para mapear ubicaciones de diferentes secuencias a lo largo de fibras de DNA individuales.

Para llevar a cabo la hibridación del ácido nucleico, ambos interactuantes deben ser de cadena simple. En el experimento representado en la figura 10-20, los cromosomas de una célula mitótica se extienden en un portaobjeto, y el DNA se hace de cadena simple, tratando los cromosomas con una solución de sal caliente, que hace que las cadenas de DNA se separen y permanezcan así. Durante el siguiente paso de hibridación, los cromosomas desnaturalizados se incuban con una solución de DNA satélite de cadena simple marcado con biotina, que se une de forma selectiva a las cadenas complementarias del DNA satélite inmóvil que se localiza en los cromosomas. Luego del periodo de incubación, el DNA satélite soluble no hibridado se elimina por lavado o se digiere, y los sitios de unión de los fragmentos de DNA marcado se revelan. Como se muestra en la figura 10-20, el DNA satélite está localizado en las regiones centroméricas del cromosoma (véase figura 12-26). Otro ejemplo que usa tecnología FISH se muestra en la **FIGURA 10-21**.

**SECUENCIAS DE DNA MODERADAMENTE REPETIDAS** La fracción moderadamente repetida de los geno-




*a*)



*b*)

**FIGURA 10-20 Hibridación fluorescente *in situ* y localización de DNA satélite.** *a*) Pasos que se toman para llevar a cabo la hibridación por fluorescencia *in situ*. En esta técnica, algunos de los nucleótidos en la sonda de DNA están enlazados de forma covalente a una pequeña molécula orgánica, generalmente la biotina. Después de la hibridación, la ubicación del DNA unido marcado con la biotina se puede visualizar tratando la preparación con avidina marcada de manera fluorescente, una proteína que se une a la biotina con muy alta afinidad. Los cromosomas, en estas preparaciones, por lo general aparecen en rojo, porque han sido contrateñidos con yoduro de propidio. *b*) Localización del DNA satélite en el centrómero de los cromosomas humanos. La ubicación del DNA satélite unido y marcado con biotina se revela por la fluorescencia amarilla, que se destaca sobre un fondo de cromosomas rojos contrastados. La fluorescencia aparece sólo en el sitio donde cada cromosoma está contraído, lo que marca la ubicación del centrómero.

FUENTE: Tomada de Huntington F. Willard. *Trends Genet* 1990;6:414, con permiso de Elsevier.

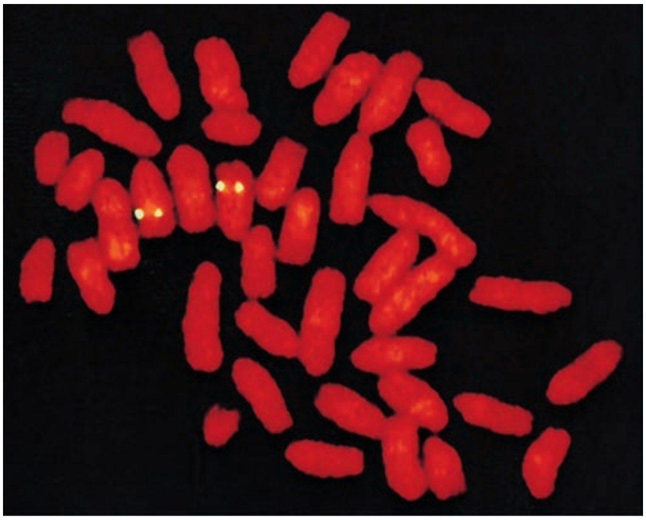


**FIGURA 10-21 Localización cromosómica de una secuencia de DNA no repetida.** Estos cromosomas mitóticos se prepararon a partir de la división de una célula de ratón y se incubaron con una preparación purificada de DNA marcado con biotina codificadora de una de las proteínas laminares nucleares (laminina $B_2$), que se codifica por un gen no repetido. Las ubicaciones del DNA marcado y unido aparecen como puntos brillantes. El gen laminina está presente en los homólogos del cromosoma 10. Cada cromosoma contiene dos copias del gen, porque el DNA había sido replicado antes de que las células ingresaran a la mitosis.

FUENTE: Tomada de Monika Zewe, *et al*. Cortesía de Werner Franke. *Eur J Cell Biol* 1991;56:349, con el permiso de Elsevier.

mas de plantas y animales puede variar desde alrededor de 20 a más de 80% del DNA total, en dependencia del organismo. Esta fracción incluye secuencias que se repiten dentro del genoma, en cualquier lugar, de unas pocas veces a decenas de miles de veces. Se incluyen en la fracción de DNA moderadamente repetida algunas secuencias que codifican productos genéticos conocidos, ya sea RNA (como RNAr) o proteínas (incluidas las histonas), pero la mayor parte de esta fracción de DNA carece de una función de codificación. En lugar de aparecer como agrupaciones de secuencias en tándem, estos elementos no codificadores están dispersos (es decir, *entremezclados*) en todo el genoma. La mayoría de estas secuencias repetidas se pueden agrupar en dos clases que se conocen como SINE (*short interspersed elements*), elementos intercalados cortos, o LINE (*long interspersed elements*), elementos intercalados largos. Las secuencias SINE y LINE se tratan en la página 393.

**SECUENCIAS DE DNA NO REPETIDAS** Como fue predicho inicialmente por Mendel, estudios clásicos sobre los patrones de herencia de los rasgos visibles llevaron a los genetistas a concluir que cada gen estaba presente en una copia por cada conjunto único de cromosomas (haploide). Cuando el DNA eucariota desnaturalizado puede reasociarse, una fracción significativa de los fragmentos es muy lenta para encontrar pareja, tan lenta de hecho, que se presume que está presente en una sola copia por genoma. Esta fracción comprende las secuencias de DNA *no repetidas* (o de *copia única*), que incluyen los genes que exhiben patrones de herencia mendelianos. Debido a que están presentes en una sola copia en el genoma, las secuencias no repetidas se localizan en un sitio particular de un cromosoma específico (figura 10-21).

Incluidas dentro de la fracción no repetida están las secuencias de DNA, las cuales codifican prácticamente todas las proteínas distintas de las histonas. Aunque estas secuencias no están presentes en copias múltiples, los genes que codifican polipéptidos son, por lo general, miembros de una familia de genes relacionados. Esto es así para las globinas, actinas, miosinas, colágenos, tubulinas, integrinas y la mayoría de las otras proteínas en una célula eucariota. Cada miembro de una familia multigénica está codificado por una secuencia diferente, pero relacionada. En la siguiente sección se tratará el origen de estas familias multigénicas.

Ahora que el genoma humano ha sido secuenciado y analizado, al fin se tiene una medida relativamente precisa de las secuencias de DNA que son responsables de codificar las secuencias de aminoácidos de las proteínas en los seres humanos, y es en extremo pequeña. Si se le hubiera sugerido a un genetista en 1960 que menos de 1.5% del genoma humano codifica los aminoácidos de las proteínas en el ser humano, habría considerado la sugerencia ridícula. Sin embargo, esa es la realidad que surgió del estudio de las secuencias del genoma. En la siguiente sección, se podrá comprender mejor cómo podría haber evolucionado el restante 98+% de las secuencias de DNA.

**REPASO**

1. ¿Qué es un genoma? ¿Cómo la complejidad de los genomas bacterianos difiere de la de los genomas eucariotas?
2. ¿Qué se entiende por el término desnaturalización del DNA? ¿Cómo la desnaturalización depende del contenido de GC del DNA? ¿Cómo afecta esta variable a la $T_m$?
3. ¿Qué es una secuencia de DNA microsatélite? ¿Qué papel desempeñan estas secuencias en las enfermedades de los seres humanos?
4. ¿Qué fracción del genoma contiene la mayor cantidad de información? ¿Por qué es esto cierto?



# 10.9 PERSPECTIVA HUMANA

## Enfermedades que resultan de la expansión de las repeticiones de trinucleótidos

Durante décadas los biólogos creyeron que los genes siempre se transmitían de generación en generación como entidades estables. En raras ocasiones, se produce un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen en la línea germinal, creando una mutación que posteriormente se hereda. Este es uno de los principios básicos de la genética mendeliana. Luego, en 1991, varios laboratorios informaron un nuevo tipo de “mutación dinámica”, en la que la secuencia de nucleótidos de genes particulares cambió drásticamente entre padres e hijos. En cada caso, estas mutaciones afectaron genes que contenían una unidad de trinucleótidos repetitiva (p. ej., CCG o CAG) como parte de su secuencia. En la mayoría de los miembros de la población, estos genes particulares contienen un número relativamente pequeño (pero variable) de trinucleótidos repetidos, y se transmiten de una generación a otra sin un cambio en el número de repeticiones. Por el contrario, una pequeña fracción de la población posee una versión mutante del gen que contiene un mayor número de estas unidades repetitivas. A diferencia de la versión normal, los alelos mutantes son muy inestables, y la cantidad de unidades repetitivas tiende a aumentar a medida que el gen pasa de los padres a la descen-

(*continúa*)

dencia. Cuando el número de las repeticiones aumenta más allá de un número crítico, el individuo que hereda el alelo mutante desarrolla una enfermedad grave.

En la actualidad, más de 20 trastornos hereditarios se han atribuido a la expansión de repeticiones de trinucleótidos. Estas enfermedades se dividen en dos categorías básicas, que se considerarán a su vez. Las enfermedades de tipo I son todos los trastornos neurodegenerativos que resultan de la expansión del número de repeticiones de un trinucleótido CAG dentro de la porción de codificación del gen mutante (**FIGURA 1**). Se puede ilustrar la naturaleza de estos trastornos considerando el más prevalente y ampliamente estudiado, la enfermedad de Huntington (*HD*, *Huntington's disease*). La HD es un padecimiento fatal caracterizado por movimientos involuntarios no coordinados, cambios en la personalidad, incluida la depresión e irritabilidad, y disminución intelectual gradual. Los síntomas usualmente comienzan de la tercera a la quinta décadas de la vida y aumentan en severidad hasta la muerte.

El *gen HD* normal, que se transmite de manera estable, contiene entre 6 y 35 copias del trinucleótido CAG. La proteína que codifica el gen *HD* se llama huntingtina, y su función precisa no está clara. El CAG es un triplete que codifica el aminoácido glutamina. Por tanto, el polipéptido huntingtina normal contiene un tramo de 6 a 35 residuos de glutamina —un tracto de poliglutamina— como parte de su estructura primaria. Se piensa que los polipéptidos tienen una estructura primaria altamente definida, y así es para la mayoría de ellos, pero la huntingtina es usualmente polimórfica con respecto a la longitud de su tracto de poliglutamina. La proteína parece funcionar de manera normal, siempre que la longitud del tramo permanezca por debajo de, aproximadamente, 35 residuos de glutamina. Pero si se excede este número, la proteína adquiere nuevas propiedades y la persona está predispuesta para desarrollar la HD.

La HD exhibe una serie de características inusuales. A diferencia de la mayoría de las enfermedades hereditarias, la HD es un trastorno genético dominante, que significa que una persona con el alelo mutante desarrollará la enfermedad, independientemente de si tiene un alelo *HD* normal. De hecho, los individuos que son homocigotos para el alelo *HD,* no se afectan más que los heterocigotos. Esta observación indica que el polipéptido huntingtina mutante causa la enfermedad, no porque no cumple una función particular, sino porque adquiere algún tipo de propiedad tóxica, que se conoce como mutación con ganancia de función. Esta interpretación está apoyada por estudios con ratones. Los ratones que están diseñados para portar el alelo mutante humano *HD* (además de sus propios alelos normales) desarrollan una enfermedad neurodegenerativa similar a la que se encuentra en los seres humanos. La presencia de un alelo anormal es suficiente para causar la enfermedad. Otra característica inusual de la HD y de los otros trastornos CAG es un fenómeno llamado anticipación genética, que significa que, a medida que la enfermedad pasa de generación en generación, su gravedad aumenta y/o golpea a edades cada vez más tempranas. Esta fue una característica desconcertante de la HD, pero ahora se explica con facilidad por el hecho de que el número de repeticiones de CAG en un alelo mutante (y las consecuencias resultantes) a menudo aumenta drásticamente de una generación a la siguiente.

La base molecular de la HD sigue sin estar clara, pero no faltan teorías sobre por qué un tracto de glutamina expandido puede ser tóxico para las células cerebrales. Una característica parece indiscutible: cuando el tracto de poliglutamina de huntingtina supera unos 35 residuos, la proteína (o un fragmento escindido de ella) sufre una alteración en el plegamiento para producir una molécula mal plegada que 1) se une a otras moléculas mutantes de huntingtina para formar agregados insolubles, no muy diferentes de los que se observan en los cerebros de las víctimas de Alzheimer, y 2) se une a un número de proteínas no relacionadas que no interactúan con moléculas de huntingtina normales, de tipo salvaje. Entre las proteínas unidas por la huntingtina mutante se encuentran varios factores de transcripción, que son proteínas involucradas en la regulación de la expresión genética. Varios de los factores de transcripción más importantes presentes en las células, incluidos TBP (véase figura 11-17) y CBP (véase figura 12-50), contienen elongaciones de poliglutamina, lo que los hace particularmente susceptibles a la agregación por proteínas con tractos de poliglutamina expandidos y mutantes. De hecho, los agregados proteicos presentes en las neuronas degenerativas de los pacientes con HD contienen ambos factores de transcripción. Estos resultados sugieren que la huntingtina mutante secuestra los factores de transcripción, alterando la transcripción de los genes que se requieren para la salud y la supervivencia de las neuronas afectadas. Esta hipótesis ha recibido apoyo de un estudio en el que los ratones fueron genéticamente diseñados para que sus células cerebrales perdieran la capacidad de producir ciertos factores de transcripción clave. Estos ratones mostraron el mismo tipo de neurodegeneración que se observa en los animales que portan un gen HD mutante. Otros procesos neuronales básicos, incluido el transporte axonal, la permeabilidad y fisión mitocondriales, síntesis de colesterol y degradación de proteínas, también se ven afectados por la mutación *HD* y representan posibles causas de la muerte de las células nerviosas. Cabe señalar que un número de investigadores de la *HD* tienen una opinión alternativa sobre la causa de la muerte celular. Argumentan que no son los agregados de proteínas los que son tóxicos, sino la proteína mutante soluble (o fragmentos de la proteína mutante) en sí. De hecho, los defensores de esto argumentan que los agregados de proteínas mutantes protegen a la célula secuestrando las moléculas dañinas. Es importante, por razones prácticas, distinguir entre estas posibilidades, porque varias terapias propuestas están destinadas a bloquear la formación de los agregados, lo que en realidad podría ser más dañino para el paciente.

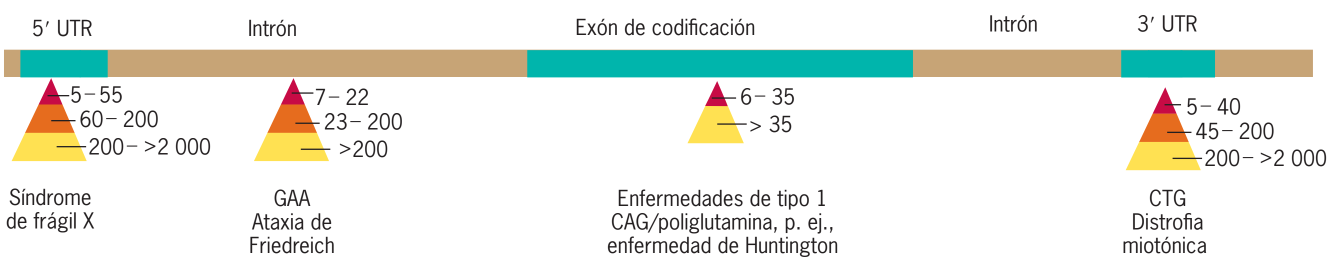



**FIGURA 1 Secuencias repetidas de trinucleótidos y enfermedad en los seres humanos.** La línea superior muestra un gen generalizado que se transcribe en un RNA mensajero con varias porciones distintas, incluida una porción 5′ no codificante llamada región 5′ no traducida (5′ UTR, 5′ *untranslated region*), un exón de codificación que transporta la información para la secuencia de aminoácidos del polipéptido, y una porción 3′ no codificante (la 3′ UTR). Los intrones en el DNA (véase figura 11-27) no están representados en el RNA mensajero maduro. La ubicación general del trinucleótido responsable de cada una de las cuatro enfermedades diferentes (síndrome de frágil X, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington y distrofia miotónica) se indica por la ubicación de cada pirámide. Se señala el número de repeticiones responsables de las condiciones de normalidad (rojo), portador (naranja) y enfermedad (amarillo) para cada gen que causa la enfermedad. Los genes responsables de las enfermedades de tipo I, como los de Huntington, no muestran el estado de "portador" intermedio en el que un individuo posee un alelo inestable, pero no se ve afectado.
FUENTE: Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd: J-L Mandel. *Nature* 1997;386:768; Copyright 1997.

Las enfermedades de repetición de trinucleótidos tipo II difieren de las enfermedades tipo I de varias maneras. Las enfermedades de tipo II: 1) surgen de la expansión de una variedad de trinucleótidos, no solo CAG, 2) los trinucleótidos involucrados están presentes en una parte del gen que no codifica aminoácidos (figura 1), 3) los trinucleótidos están sujetos a expansión masiva en miles de repeticiones, y 4) las enfermedades afectan numerosas partes del cuerpo, no sólo el cerebro. La enfermedad tipo II que mejor se ha estudiado es el síndrome de frágil X, llamado así porque el cromosoma X mutante es especialmente susceptible al daño. El síndrome de frágil X también se caracteriza por retraso mental, así como por una serie de anomalías físicas. La enfermedad es causada por una mutación dinámica en un gen llamado *FMR1* que codifica una proteína de unión a RNA que regula la traducción de ciertos RNAm involucrados en el desarrollo neuronal y/o en la función sináptica. Un alelo normal de este gen contiene entre 5 y 55 copias de un trinucleótido específico (CGG) que se repite en una parte del gen que corresponde a la porción no codificante 59 del RNA mensajero (figura 1). Sin embargo, una vez que el número de las copias se eleva por encima de 60, el *locus* se vuelve muy inestable y el número de copias tiende a aumentar rápidamente en miles. Las mujeres con un gen *FMR1,* que contiene de 60 a 200 copias del triplete, generalmente exhiben un fenotipo normal, pero son portadoras para la transmisión de un cromosoma altamente inestable a su descendencia. Si el número de repetición en la descendencia se eleva por encima de 200, el individuo casi siempre tiene retraso mental. A diferencia de un alelo *HD* anormal, que causa la enfermedad como resultado de una ganancia de función, un alelo *FMR1* anormal causa la enfermedad debido a una pérdida de la función; los alelos *FMR1* que contienen un número CGG expandido se inactivan selectivamente por lo que el gen no se transcribe ni se traduce. Aunque en la actualidad no existe un tratamiento para alguna de las enfermedades causadas por la expansión de los trinucleótidos, el riesgo de transmitir o poseer un alelo mutante puede ser evaluado mediante cribado genético.



## 10.10 Estabilidad del genoma: duplicación

Debido a que el DNA es el material genético, se tiende a pensar que es una molécula conservadora, cuyo contenido de información cambia lentamente durante largos periodos evolutivos. En realidad, la organización de la secuencia del genoma es capaz de un cambio rápido, no sólo de una generación a la siguiente, sino durante la vida de un individuo dado.

### Duplicación completa del genoma (poliploidización)

Como se discutió en las primeras secciones de este capítulo, los guisantes y las moscas de la fruta tienen pares de cromosomas homólogos en cada una de sus células. Se dice que estas células tienen un número **diploide** de cromosomas. Si una persona fuera a comparar el número de cromosomas presentes en las células de organismos estrechamente relacionados, en especial plantas superiores, encontraría que algunas especies tienen un número mucho mayor de cromosomas que un pariente cercano. Entre los animales, el anfibio ampliamente estudiado *Xenopus laevis*, por ejemplo, tiene el doble de cromosomas que su primo *X. tropicalis*. Este tipo de discrepancia se puede explicar por un proceso conocido como **poliploidización**, o **duplicación completa del genoma**. La poliploidización es un evento en el que se producen descendientes que tienen el doble de cromosomas en cada célula que sus padres diploides; la descendencia tiene cuatro homólogos de cada cromosoma, en lugar de dos. La poliploidización se cree que ocurre de dos maneras: dos especies relacionadas se aparean para formar un organismo híbrido que contiene los cromosomas combinados de ambos padres, o, como alternativa, un embrión unicelular sufre duplicación cromosómica, pero los duplicados, en lugar de dividirse en células separadas, se retienen en una sola célula que se desarrolla en un embrión viable. El primer mecanismo ocurre con mayor frecuencia en las plantas, y el segundo, más a menudo, en los animales. La poliploidización es, en particular, común en las plantas con floración, que incluyen numerosas especies de cultivos (por ejemplo, trigo, plátanos y café) representadas en la **FIGURA 10-22**. Cuando se produce la poliploidización en un linaje de una planta, el número de cromosomas se duplica repentinamente y, en la mayoría de los casos, tiende a regresar al número diploide original en un periodo de evolución posterior. Como resultado, diferentes especies de plantas modeRNA se capturan en varias etapas del proceso evolutivo de selección de su número de genes. Esta es la razón por la cual los genomas de diferentes plantas tienden a tener una variación mucho mayor en el número de genes que el que exhiben diferentes animales (véase figura 10-28).




**FIGURA 10-22 Muestra de cultivos agrícolas que son poliploides.** En la foto se ven aceite de colza, pan de trigo, cuerda de sisal, granos de café, plátano, algodón, papas y maíz.

FUENTE: De AR Leitch e IJ Leitch. *Science* 2008;320:481; © 2008, reimpreso con permiso de AAAS.

Una duplicación "repentina" del número de cromosomas es un evento impresionante, que le otorga a un organismo un potencial evolutivo notable, asumiendo que pueda sobrevivir al aumento de la cantidad de cromosomas y reproducirse. Dependiendo de las circunstancias, la poliploidización puede resultar en la producción de una nueva especie que tenga una gran cantidad de información genética "extra". Varios destinos diferentes pueden ocurrirle a las copias adicionales de un gen; se pueden perder por deleción, convertirse en inactivos por mutaciones deletéreas o, lo que es más importante, pueden evolucionar hacia nuevos genes que posean nuevas funciones. Visto de esta manera, la información genética adicional es la materia prima para diversificar la evolución. En 1971, Susumu Ohno, del City Hope Cancer Center, en Los Ángeles, presentó la hipótesis "2R", con la que propuso que la evolución de los vertebrados a partir de un invertebrado simple ancestral fue posible por dos rondas separadas de duplicación del genoma completo durante un periodo evolutivo temprano. Ohno sugirió que los miles de genes adicionales que serían generados por la duplicación del genoma podrían ser moldeados

por la selección natural en nuevos genes, que se necesitarían para codificar el cuerpo más complejo de los vertebrados. En las últimas tres décadas y media, la propuesta de Ohno ha sido muy debatida, debido a que los genetistas han intentado encontrar evidencia que apoye o refute esa noción.

El problema al que se enfrentan los analistas del genoma es el gran lapso de tiempo que ha pasado —cientos de millones de años— desde el origen de los primeros vertebrados ancestros. Así como un río o el mar desaparece lentamente de la faz de la Tierra, el reordenamiento cromosómico y la mutación desgastan la superficie de un genoma ancestral de manera paulatina. Incluso con la secuencia completa de genomas de varios invertebrados y vertebrados en la mano, se ha demostrado que representa un desafío formidable identificar el origen de muchos de nuestros genes. La evidencia más fuerte para la hipótesis del 2R proviene del análisis del genoma de los anfioxos. Los anfioxos carecen de una columna vertebral, lo que los convierte en invertebrados, pero tienen una serie de características (p. ej., notocorda, cordón nervioso tubular dorsal y musculatura corporal segmentaria) que los identifican claramente como miembros del *phylum Chordata,* al que pertenecen los vertebrados. Se piensa que los linajes que condujeron a los modernos vertebrados y anfioxos se separaron hace unos 550 millones de años, sin embargo, los dos grupos comparten una notable colección similar de genes. No obstante, cuando los investigadores observaron más de cerca a ciertos grupos de genes, los genomas de los vertebrados contenían normalmente cuatro veces el número de tales genes, en comparación con las secuencias homólogas en el genoma de los anfioxos. Este hallazgo proporciona un acentuado apoyo a la hipótesis de Ohno de las dos rondas de duplicación del genoma completo en el linaje de los vertebrados ancestrales.

## Duplicación y modificación de secuencias de DNA

La poliploidización es un caso extremo de duplicación del genoma y ocurre sólo rara vez durante la evolución. Por el contrario, la **duplicación de genes**, que se refiere a la duplicación de una pequeña porción de un solo cromosoma, se produce con una frecuencia sorprendentemente alta, y su ocurrencia se documenta con facilidad mediante el análisis del genoma.[3] De acuerdo con una estimación, cada gen en el genoma tiene alrededor de 1% de posibilidad de ser duplicado cada millón de años. La duplicación de un gen es probable que pueda ocurrir mediante varios mecanismos diferentes, pero lo que se cree con más frecuencia es que se produce por un proceso de *entrecruzamiento desigual*, como se representa en la **FIGURA 10-23*b*)**. El entrecruzamiento desigual acontece cuando un par de cromosomas homólogos se juntan durante la meiosis, de tal manera que no están perfectamente alineados. Como resultado de la desalineación, el intercambio genético entre los homólogos provoca que un cromosoma adquiera un segmento adicional de DNA (una duplicación) y el otro cromosoma pierda un segmento de DNA (una deleción). Si la duplicación de una secuencia particular se repite en posteriores generaciones, se genera un grupo de segmentos repetidos en tándem en un sitio localizado dentro de ese cromosoma (véase figura 10-29).

[3] En realidad, se pueden distinguir tres categorías de duplicación: el genoma completo, el gen y la duplicación segmentaria. La última categoría, que se refiere a la duplicación de un gran bloque de material cromosómico (desde unas pocas kilobases hasta cientos de kilobases en longitud) no se discute aquí, pero tiene un impacto significativo en la evolución del genoma. Aproximadamente 5% del genoma humano actual consiste en duplicaciones segmentarias que han surgido durante los últimos 35 millones de años.

La gran mayoría de genes duplicados se pierden durante la evolución a través de la deleción o se vuelven no funcionales por mutación desfavorable. Sin embargo, en un pequeño porcentaje de casos, la copia "extra" acumula mutaciones favorables y adquiere una nueva función. Con mayor frecuencia, ambas copias del gen sufren una mutación, de modo que cada una evoluciona a una función más especializada que la realizada por el gen original. En cualquier caso, los dos genes tendrán secuencias estrechamente relacionadas y codificarán polipéptidos similares, lo que quiere decir que codifican diferentes isoformas de una proteína particular, como la tubulina α y β (sección 9.2). Las duplicaciones posteriores de uno de los genes pueden conducir a la formación de isoformas adicionales (p. ej., la tubulina γ), y así sucesivamente. Eso resulta evidente a partir del ejemplo en el que la duplicación de genes sucesivos puede generar familias de genes que codifican polipéptidos con secuencias de aminoácidos relacionadas. La producción de una familia multigénica se ilustra por la evolución de los genes de globina.

## Evolución de los genes de la globina

La hemoglobina es un tetrámero compuesto por cuatro polipéptidos de globina (véase figura 2-40*b*). El estudio de los genes de globina, ya sea de un mamífero o un pez, revela una organización característica. Cada uno de estos genes está construido de tres exones y dos intrones. Los exones son partes de genes que codifican aminoácidos en el polipéptido codificado, mientras que los intrones no lo hacen; son secuencias intermedias no codificantes. El tema de los exones y los intrones se trata en detalle en la sección 11.6 (véase figura 11-21). Para los propósitos actuales, simplemente se usarán estas partes del gen como hitos de la evolución. El examen de genes que codifican ciertos polipéptidos similares a la globina, como la proteína vegetal leghemoglobina y

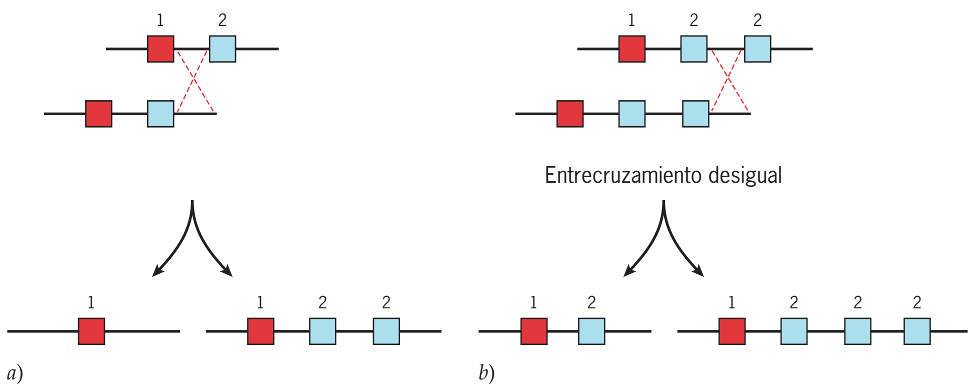



**FIGURA 10-23 El entrecruzamiento desigual entre los genes duplicados proporciona un mecanismo para generar cambios en el número de genes.** *a*) El estado inicial muestra que tiene dos genes relacionados (1 y 2). En un individuo diploide, el gen 1 en un homólogo puede alinearse con el gen 2 en el otro homólogo durante la meiosis. Si un entrecruzamiento se produce durante esta desalineación, la mitad de los gametos carecerán del gen 2 y la mitad tendrá un gen adicional 2. *b*) A medida que el entrecruzamiento desigual continúa ocurriendo durante las divisiones meióticas en las generaciones posteriores, una serie de secuencias de DNA repetidas en tándem evolucionarán gradualmente.

la proteína muscular mioglobina, revela la presencia de cuatro exones y tres intrones. Esto se propone para representar la forma ancestral del gen de la globina. Se piensa que el polipéptido moderno de globina surgió de la forma ancestral, como resultado de la fusión de dos de los exones de la globina (paso 1, **FIGURA 10-24**) hace unos 800 millones de años.

Se conocen varios peces primitivos que tienen sólo un gen de globina (paso 2), lo cual sugiere que estos peces se diferenciaron de otros vertebrados antes de la primera duplicación del gen de globina (paso 3). Después de esta duplicación, hace aproximadamente 500 millones de años, dos copias divergieron por mutación (paso 4) para formar dos tipos distintos de globina, un tipo α y uno β, ubicados en un solo cromosoma. Esta es la disposición actual en el anfibio *Xenopus* y en el pez cebra. En pasos posteriores, se cree que las formas α y β se separaron unas de las otras mediante un proceso de reorganización que las movió a cromosomas separados (paso 5). Entonces cada gen experimentó duplicaciones y divergencias ulteriores (paso 6), generando la disposición de los genes de globina que existe actualmente en los seres humanos (paso 7). La evolución de los genes de globina de vertebrados ilustra cómo la duplicación de genes por lo general conduce a la generación de una familia de genes, cuyos miembros individuales tienen funciones especializadas (en este caso, formas embrionarias, fetales y adultas) en comparación con el único gen fundador.

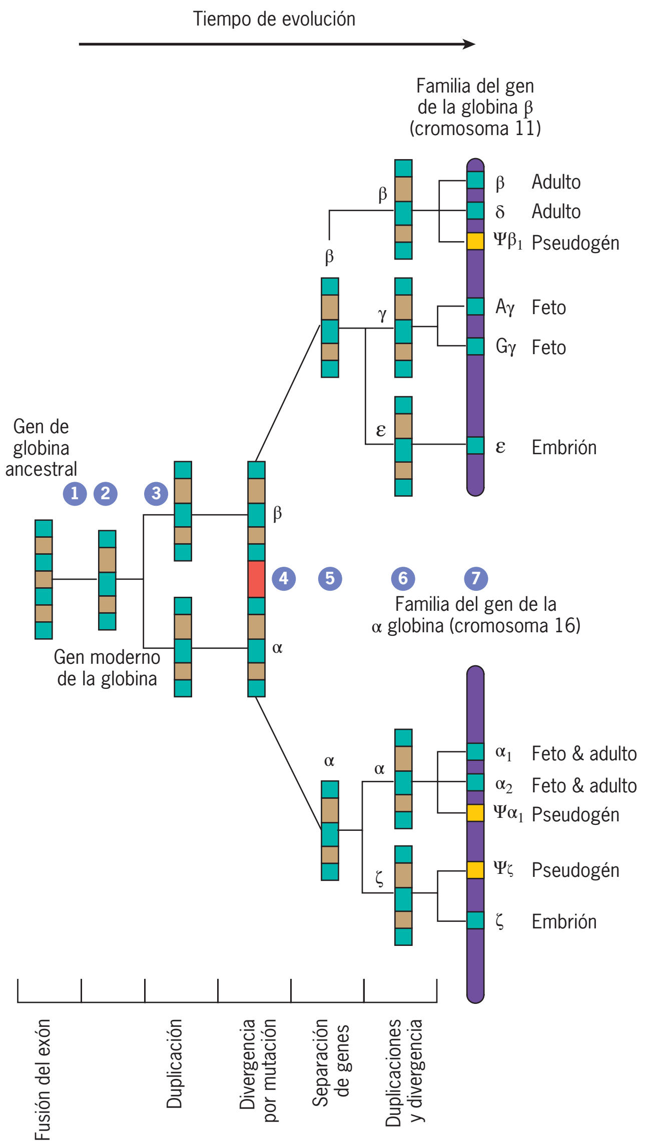



**FIGURA 10-24 Vía para la evolución de los genes de globina.** Los exones se muestran en verde, los intrones en marrón. Los pasos evolutivos representados en el diagrama se discuten en el texto. La disposición de los genes de globina α y β en los cromosomas humanos 16 y 11 (que se muestran en color púrpura sin sus intrones en el paso 7) son los productos de varios cientos de millones de años de evolución. Como se argumentó en el capítulo 2, las moléculas de hemoglobina consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas: un par es siempre un miembro de la subfamilia de la globina α, y el otro par siempre es miembro de la subfamilia de globina β. Las combinaciones específicas de globinas α y β se encuentran en diferentes etapas de desarrollo. Se indican las cadenas de globina α y β que se observan en las hemoglobinas embriónicas, fetal y adulta.

Cuando se analizaron las secuencias de DNA de los grupos de genes de globina, los investigadores encontraron “genes”, cuyas secuencias son homólogas a las de los genes de globina funcionales, pero que han acumulado graves mutaciones que las hacen no funcionales. Los genes de este tipo, que son reliquias evolutivas, se conocen como **pseudogenes**. Se encuentran ejemplos de pseudogenes en los grupos de genes de globina α y β humana de la figura 10-24. El genoma humano contiene un estimado de 11 000 pseudogenes. Aunque los pseudogenes no codifican proteínas funcionales, pueden transcribirse en RNA, que puede tener funciones reguladoras. Otro punto que es evidente a partir del estudio de los dos grupos de globina de los cromosomas humanos es que gran parte del DNA consiste en secuencias no codificantes, ya sea como intrones dentro de los genes o como espaciadores entre los genes. De hecho, las regiones de globina contienen una fracción mucho mayor de secuencias de codificación que la mayoría de las otras regiones del genoma.

**REPASO**

1. Describa el curso de los eventos evolutivos que se cree que dan lugar a familias de genes múltiples, como aquellas que codifican las globinas. ¿Cómo pudieron estos eventos dar lugar a los pseudogenes? ¿Cómo pudieron originar proteínas que tienen funciones completamente diferentes?

## 10.11 Naturaleza dinámica del genoma: “genes saltarines”

Si se observan secuencias repetidas que han surgido durante el curso normal de la evolución, se encuentra que las repeticiones a veces están presentes en matrices en tándem, en ocasiones en dos o unos pocos cromosomas (como en el caso de los genes de globina de la figura 10-24) y algunas veces están dispersas por todo el genoma. Si se supone que todos los miembros de una familia de secuencias repetidas surgieron de una sola copia, entonces ¿cómo pueden los miembros individuales dispersarse entre diferentes cromosomas?

La primera persona en sugerir que los elementos genéticos eran capaces de moverse alrededor del genoma fue Barbara McClintock, una genetista que trabaja con el maíz en los Laboratorios Cold Spring Harbor, en Nueva York. Los rasgos genéticos en el maíz a menudo se revelan como cambios en los patrones y las marcas en la coloración de la hoja y el grano (**FIGURA 10-25**). A fines de la década de 1940, McClintock descubrió que ciertas mutaciones eran muy inestables, apareciendo y desapareciendo de una generación a la siguiente, o incluso durante la vida de una planta individual. Después de varios años de cuidadoso estudio, ella concluyó que ciertos elementos genéticos se movían de un lugar en un cromosoma a un sitio completamente diferente. A este reordenamiento genético le llamó **transposición**, y **elemen-**



**FIGURA 10-25 Manifestaciones visibles de transposición en el maíz.** Los granos de maíz son típicamente uniformes en el color. Las manchas en estas semillas son el resultado de una mutación en un gen que codifica una enzima involucrada en la producción del pigmento. Las mutaciones de este tipo pueden ser muy inestables, surgir o desaparecer durante el periodo en el que se desarrolla una única semilla. Estas mutaciones inestables aparecen y desaparecen como resultado del movimiento de elementos transponibles dentro y fuera de estos genes durante el periodo de desarrollo.

FUENTE: Cortesía de Venkatesan Sundaresan, Laboratorio Cold Spring Harbor.

**tos transponibles** a los elementos genéticos móviles. Mientras tanto, los biólogos moleculares que trabajan con bacterias no encontraron evidencia de "genes saltarines". En sus estudios, los genes aparecieron como elementos estables situados en una matriz lineal en el cromosoma que permaneció constante de un individuo a otro y de una generación a la siguiente. Los hallazgos de McClintock fueron ampliamente ignorados.

## Transposones

A finales de la década de 1960, varios laboratorios descubrieron que ciertas secuencias de DNA en bacterias se movían en raras ocasiones desde un lugar en el genoma a otro. Estos elementos transponibles bacterianos fueron denominados **transposones**. La mayoría de los transposones codifican una proteína o *transposasa*, que por sí sola cataliza la escisión de un transposón desde un sitio del DNA donante y su posterior inserción en un sitio del DNA blanco. Este mecanismo de "corta y pega" está mediado por dos subunidades de transposasa que se unen a secuencias repetidas e invertidas en los dos extremos del transposón (**FIGURA 10-26**, paso 1). Luego, las dos subunidades se unen para formar un dímero activo (paso 2) que cataliza una serie de reacciones que conducen a la escisión del transposón (paso 3). El complejo transposasa-transposón posteriormente se une a un DNA blanco (paso 4), donde la transposasa cataliza las reacciones requeridas para integrar el transposón en su nueva residencia (paso 5). Por lo común, la integración del elemento crea una pequeña duplicación en el DNA blanco que flanquea el elemento transponible en el sitio de inserción. Las duplicaciones de sitio blanco sirven como "huellas" para identificar los sitios en el genoma que están ocupados por elementos transponibles.

Como lo demostró originalmente McClintock, los genomas eucariotas contienen una gran cantidad de elementos transponibles. De hecho, *dos tercios* del genoma humano han derivado de elementos transponibles. La gran mayoría (>99%) de elementos transponibles son incapaces de moverse de un lugar a otro; ellos han sido mutilados por la mutación o su movimiento es suprimido por la célula. (La supresión ocurre por medio de pequeños RNA celulares [sección 11.12] y la metilación de DNA [sección 12.4]). Sin embargo, cuando los elementos transponibles cambian de posición, se insertan ampliamente en todo el DNA blanco. De hecho, muchos elementos transponibles pueden insertarse dentro del centro de un gen codificador de proteínas. Varios ejemplos de tal ocurrencia han sido documentados en los seres humanos, incluyendo varios casos de hemofilia causada por un elemento genético móvil que había "saltado" al centro de uno de los genes clave de la coagulación sanguínea. Se estima que aproximadamente 1 de cada 500 enfermedades que causan mutaciones en los seres humanos es el resultado de la inserción de un elemento transponible. Además, la reactivación de elementos transponibles puede contribuir al desarrollo de ciertos cánceres.

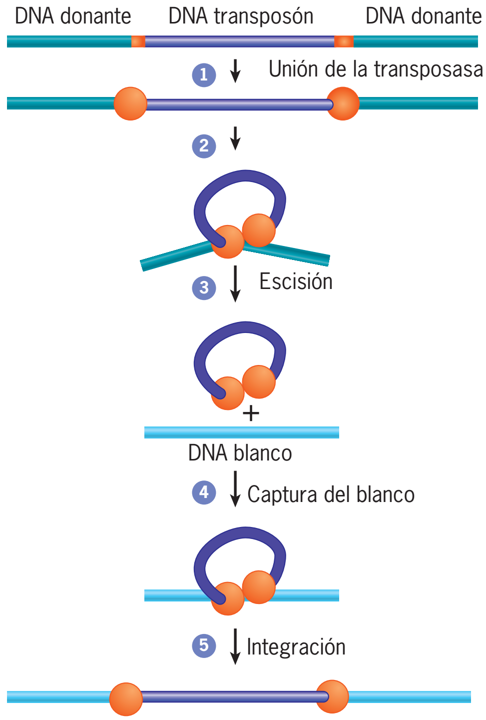



**FIGURA 10-26 Transposición de un transposón bacteriano mediante un mecanismo de "corte y pega".** Como se discutió en el texto, los dos extremos del transposón Tn5 bacteriano está flanqueado por secuencias repetidas (segmentos de color naranja). Los dos extremos se unen mediante la dimerización de un par de subunidades de la transposasa (esferas de color naranja). Ambas cadenas de doble hélice son escindidas en cada extremo, que corta el transposón como parte de un complejo con la transposasa. El complejo transposón-transposasa es "capturado" por un DNA blanco, y el transposón se inserta de tal manera que produce una pequeña duplicación que flanquea el elemento transpuesto. (*Nota:* No todos los transposones de DNA se mueven mediante este mecanismo.)

FUENTE: Tomada de DR Davies, *et al. Science* 2000;289:77; Copyright 2000, reimpreso con permiso de AAAS.

En la **FIGURA 10-27** se ilustran dos tipos principales de elementos transponibles eucariotas, los transposones de DNA y los retrotransposones, y su mecanismo distinto de transposición. Como se describió anteriormente para las procariotas, la mayoría de los transposones eucariotas del DNA se escinden del DNA en el sitio donante y se insertan en un sitio blanco distante (figura 10-27*a*). Este mecanismo de "corta y pega" se utiliza, por ejemplo, por los miembros de la familia de transposones *marineros*, que se encuentran en todo el reino vegetal y animal. Los **retrotransposones**, en contraste, operan por medio de un mecanismo de "copia y pega" que implica un RNA intermedio (figura 10-27*b*). El DNA del elemento transponible se transcribe, produciendo un RNA, el que se "transcribe de forma inversa" por una enzima llamada **transcriptasa inversa**, que produce un DNA complementario. La copia de DNA es de doble cadena, y luego se integra en un sitio de DNA blanco. En la mayoría de los casos, el retrotransposón en sí contiene la secuencia de códigos para

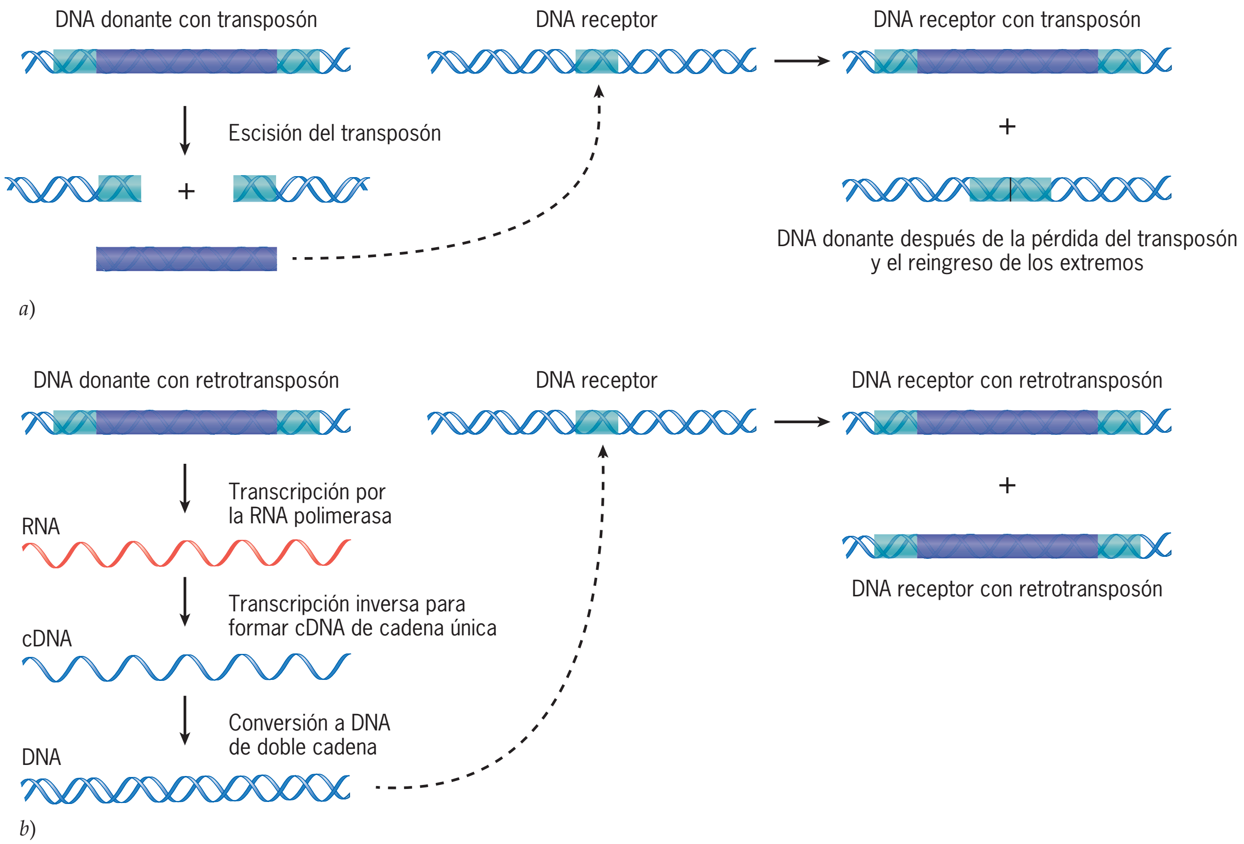



**FIGURA 10-27 Vías esquemáticas en el movimiento de elementos transponibles.** *a*) Los transposones de DNA se mueven por una vía de copia y pega, cuyo mecanismo se muestra en la figura 10-26. Aproximadamente 3% del genoma humano consiste en transposones de DNA, ninguno de los cuales es capaz de la transposición (es decir, todos son reliquias que quedan en el genoma como resultado de la actividad ancestral). *b*) Los retrotransposones se mueven por una vía de copia y pega. Los pasos están involucrados en la retrotransposición que tiene lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma, y requieren numerosas proteínas, incluidas las del huésped. Más de 40% del genoma humano consiste en retrotransposones, se cree que sólo algunos de ellos (p. ej., 40-100) son capaces de la transposición. Se conoce más de un mecanismo de retrotransposición.

una transcriptasa inversa. Los retrovirus, como el virus responsable del sida, usan un mecanismo muy similar para replicar su genoma de RNA e integrarse a una copia de DNA en un cromosoma huésped.

## Función de los elementos genéticos móviles en la evolución del genoma

En la página 386 se comentó que las secuencias de DNA moderadamente repetidas constituyen una porción significativa de genomas eucariotas. A diferencia de la fracción altamente repetida del genoma (DNA satélite, minisatélite y microsatélite), cuyas secuencias residen en tándem y surgen por duplicación del DNA, la mayoría de las secuencias moderadamente repetidas del genoma se intercalan y surgen por la transposición de los elementos genéticos móviles. De hecho, las dos familias más comunes de secuencias repetidas en el DNA humano —las familias *Alu* y L1— son retrotransposones. Recuerde de la página 387 que existen dos clases de elementos intercalados, SINE y LINE. *Alu* es un ejemplo de los primeros y L1 es un ejemplo de los últimos. Una secuencia L1 transponible de longitud completa (al menos 6 000 pares de bases de longitud) codifica una única proteína con dos actividades catalíticas: una transcriptasa inversa que hace una copia de DNA del RNA que lo codifica, y una endonucleasa que corta el DNA blanco antes de la inserción. Se estima que el genoma humano contiene alrededor de 500 000 copias de L1, pero la gran mayoría de estas son elementos incompletos e inmóviles. Aun así, la movilidad L1 continúa afectando la evolución humana. En un estudio, por ejemplo, que comparó las secuencias de DNA de 25 personas diferentes, dos de los individuos en el grupo difirieron en la presencia o ausencia de un elemento L1, como promedio, en 285 sitios en sus respectivos genomas.

Aún más abundantes que L1 son las secuencias *Alu*, que se intercalan en más de un millón de sitios diferentes en todo el genoma humano. *Alu* es una familia de secuencias cortas y relacionadas de, aproximadamente, 300 pares de bases de longitud. La secuencia *Alu* se asemeja mucho a la del RNA pequeño presente en las partículas de reconocimiento de señal encontradas en conjunto con los ribosomas unidos a la membrana (figura 8-12). Se presume que durante el curso de la evolución, este RNA citoplasmático se copió en una secuencia de DNA mediante transcriptasa inversa y se integró al genoma. Se cree que la enorme amplificación de la secuencia *Alu* se produjo por retrotransposición con el uso de la transcriptasa inversa y la endonucleasa codificada por las secuencias de L1.

Dada su prevalencia en el genoma humano, se podría esperar que la secuencia *Alu* se repita en los genomas a lo largo del resto del reino animal, pero este no es el caso. Los estudios genómicos comparativos indican que la secuencia *Alu* apareció por primera vez como un elemento transponible en el genoma de los primates, hace unos 60 millones de años, y ha ido aumentando en número de copias desde entonces. La tasa de transposición *Alu* se ha reducido drásticamente a lo largo de la evolución de los primates a su tasa estimada actual en los seres humanos de alrededor de una vez cada 200 nacimientos. Estos eventos de transposición generan diferencias en las locaciones de secuencias *Alu* de una persona a otra, y, por tanto, contribuyen a la diversidad genética en la población humana (sección 10.15).

Cuando se descubre algo nuevo, como un elemento de transposición en un organismo, la primera pregunta de un biólogo suele ser: ¿Cuál es su función? Muchos investigadores que estudian la transposición creen que los elementos transponibles son, principalmente, "basura". Según este punto de vista, el elemento transponible es un tipo de parásito genético que puede invadir a un genoma huésped desde el mundo exterior, se dispersa dentro de ese genoma y se transmite a la descendencia, siempre y cuando no tenga efectos adversos serios sobre la capacidad del huésped para sobrevivir y reproducirse. Incluso si este es el caso, no significa que los elementos transponibles no puedan hacer contribuciones positivas a los genomas eucariotas. Se debe tener en cuenta que la evolución es un proceso oportunista; no existe un camino preestablecido que deba seguirse. Independientemente de su origen, una vez que una secuencia de DNA está presente en un genoma, tiene el *potencial* de ser "puesta en uso" de alguna manera beneficiosa durante el curso de la evolución. Por esta razón, la parte del genoma formada por elementos transponibles se conoce como "patio de desecho genético". Existen varias formas en que los elementos transponibles parecen haber estado involucrados en la evolución adaptativa:

1. Los elementos transponibles pueden, en ocasiones, llevar partes adyacentes del genoma huésped con ellos mientras se mueven de un sitio a otro. Teóricamente, dos segmentos no enlazados del genoma huésped podrían unirse para formar un nuevo segmento compuesto. Este puede ser un mecanismo primario en la evolución de las proteínas, que están compuestas por dominios derivados de diferentes genes ancestrales (como en la figura 2-38).
2. Las secuencias de DNA que originalmente se derivaron de elementos transponibles se encuentran como partes de genes eucariotas, así como partes de los segmentos de DNA que regulan la expresión génica. Por ejemplo, varios factores de transcripción, que son las proteínas que regulan la expresión génica, se unen a sitios en el DNA que se originaron de elementos transponibles. Incluso cuando no hay evidencia directa de una función, muchos elementos transponibles son muy similares en posición y secuencia a los elementos en los genomas de parientes vertebrados distantes. Este tipo de conservación evolutiva sugiere que estas secuencias llevan a cabo una función beneficiosa en las vidas de sus huéspedes (sección 10.13).
3. En algunos casos, los propios elementos transponibles parecen haber dado lugar a genes. La enzima telomerasa, que desempeña una función clave en la replicación del DNA en los extremos de los cromosomas (véase figura 12-24*c*), puede derivarse de una transcriptasa inversa codificada por un antiguo retrotransposón. Se cree que las enzimas involucradas en la reordenación de los genes de los anticuerpos (véase figura 17-18) se derivan de una transposasa codificada por un antiguo transposón de DNA. Si este es el caso, la capacidad del ser humano para prevenir enfermedades infecciosas es una consecuencia directa de la transposición.
4. Varios estudios recientes han encontrado evidencia de que las células cerebrales de los mamíferos tienen un nivel muy elevado de retrotransposición de L1, en comparación con las de otros tejidos. Se supone que estos elementos móviles, que se insertan en diferentes sitios en los genomas de las neuronas, contribuyen a las diferencias funcionales en las actividades de las células cerebrales.

Un punto está claro: la transposición ha tenido un profundo impacto en la composición genética de los organismos.

Es interesante pensar en que, hace sólo unas décadas, los biólogos moleculares consideraron que el genoma es un depósito estable de información genética. Ahora sorprende que los organismos puedan mantenerse, de un día para otro, ante esta interrupción a gran escala por el reordenamiento genético. En retrospectiva, no resulta asombroso que esa transposición fuera descubierta por primera vez en las plantas, porque los elementos transponibles tienden a ser mucho más activos en las plantas, que en otros eucariotas. Por su descubrimiento de la transposición, Barbara McClintock fue la única galardonada con un Premio Nobel, en 1983, a los 81 años, aproximadamente 35 años después de su informe inicial.

**REPASO**

1. Describa dos mecanismos por los cuales los elementos genéticos son capaces de moverse de un sitio a otro en el genoma.
2. Describa el impacto que han tenido los elementos transponibles en la estructura del genoma humano en los 50 millones de años pasados.

## 10.12 Secuenciación de genomas: huellas de la evolución biológica

Determinar la secuencia de nucleótidos de todo el DNA en un genoma es una tarea formidable. Durante los años 1980 y 1990, la tecnología para lograr este esfuerzo mejoró gradualmente a medida que los investigadores desarrollaron nuevos vectores para clonar grandes segmentos de DNA y procedimientos cada vez más automatizados para determinar las secuencias de nucleótidos de estos fragmentos grandes (discutidos en la sección 18.22). La primera secuencia completa de un organismo procariota se informó en 1995, y la primera secuencia completa de un eucariota, la levadura en ciernes *S. cerevisiae*, fue publicada al año siguiente. En los próximos años —mientras la comunidad científica esperaba los resultados del trabajo en el genoma humano— se reportaron las secuencias genómicas de numerosos organismos procariotas y eucariotas (incluida la mosca de la fruta, un nemátodo y una planta de flores). Los investigadores pudieron secuenciar estos genomas con relativa rapidez, porque son considerablemente más pequeños que el genoma humano, que contiene unos 3.2 mil millones de pares de bases. Para tener una perspectiva de este número, si cada par de bases en el DNA fuera equivalente a una sola letra en esta página, la información contenida en el genoma humano produciría un libro de alrededor de un millón de páginas.

En 2001, el borrador de la secuencia de nucleótidos del genoma humano había sido publicado. La secuencia se describió como "aproximada", porque cada segmento fue secuenciado un promedio de unas cuatro veces, que no es suficiente para garantizar la precisión completa, y muchas regiones que resultaron difíciles de secuenciar fueron excluidas. Los primeros intentos para anotar la secuencia genómica humana, es decir, para interpretar la secuencia en términos de la cantidad y tipos de genes que codifica, condujeron a una sorprendente observación sobre el número de genes. Los investigadores concluyeron que el genoma humano es probable que contenga cerca de 30 000 genes que codifican proteínas. Hasta que fue secuenciado, se había asumido, ampliamente, que el genoma humano contenía, al menos, 50 000, y tal vez, hasta 150 000 genes diferentes.

La versión "finalizada" de la secuencia del genoma humano se informó en 2004, lo que significó que 1) cada sitio se había secuenciado de 7 a 10 veces para garantizar un alto grado de precisión (al menos 99.99%), y 2) la secuencia contenía un número mínimo de lagunas. Las lagunas que persistieron contienen regiones de los cromosomas, a menudo denominadas "materia oscura", que consisten, fundamentalmente, en tramos largos de DNA altamente repetido, en especial los que se encuentran en, y alrededor de, los centrómeros de cada cromosoma. A pesar de los esfuerzos exhaustivos, estas regiones han demostrado ser imposibles de clonar, o sus secuencias han resultado imposibles de ordenar de manera correcta usando la tecnología actual.

A pesar de este notable logro en la secuenciación de nucleótidos, el número real de genes que codifican proteínas en el genoma humano sigue siendo incierto. La identificación de genes mediante el uso de varios programas informáticos (algoritmos) ha estado plagada de dificultades, y, de hecho, la estimación anterior de 30 000 genes humanos que codifican proteínas ha ido disminuyendo en las constantes revisiones. Aunque ha sido como una conmoción para la mayoría de los biólogos, ¡las estimaciones actuales colocan el número cercano a 21 000! Esto significa que los seres humanos tienen, aproximadamente, el mismo número de genes que codifican proteínas que un gusano microscópico, cuyo cuerpo entero —sistema nervioso incluido— consta de unas 1 000 células (**FIGURA 10-28**).[4]

Es evidente, a partir de estos datos, que no es posible, como una vez se pensó, entender la naturaleza de un organismo simplemente conociendo una lista de los genes que componen su genoma. Si las diferencias en la complejidad entre los organismos no pueden explicarse por la cantidad de genes que codifican proteínas en sus genomas, ¿cómo se pueden explicar? Realmente no tenemos una muy buena respuesta a esa pregunta, pero podemos enumerar algunas posibilidades para considerar.

1. Como se describirá en el capítulo 12, un solo gen puede codificar un número de proteínas relacionadas como resultado de un proceso denominado *empalme alternativo* (véase sección 12.18). Varios estudios recientes sugieren que más de 90% de los genes humanos podrían participar en el empalme alternativo, por lo que el número real de proteínas codificadas por el genoma humano es, al menos, varias veces mayor que el número de los genes que contiene. Es probable que surjan mayores diferencias entre los organismos cuando se exploren más a fondo este y otros mecanismos de "mejora genética". Esta expectativa es consistente con las observaciones de que los genes de los vertebrados tienden a ser más complejos (es decir, contienen más exones) que los de moscas y gusanos, y exhiben una mayor incidencia de empalme alternativo.
2. Los biólogos moleculares han dedicado un enorme esfuerzo al estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica. A pesar de ello, la comprensión de estos mecanismos es muy limitada. Se ha aprendido, por ejemplo, que más de 70% del genoma se transcribe en una confusa matriz de RNA, pero se tiene muy poca información sobre lo que la mayoría de estos RNA hace dentro de la célula. Existe una creencia, que va en aumento, de que muchos de estos RNA tienen una función reguladora de genes. También hay una creciente evidencia de que el número y la complejidad de estos RNA no codificantes pueden estar correlacionados con los niveles de complejidad de diversos organismos. En un estudio, por ejemplo, los investigadores trataron de identificar el número de los microRNA que producen diversos organismos. Como se analiza en el siguiente capítulo, los microRNA son uno de los RNA reguladores mejor estudiados. Los investigadores encontraron que las esponjas expresaron, aproximadamente, 10 microRNA diferentes, y las anémonas de mar, alrededor de 40. Compare esto con los cerca de 150 identificados en gusanos y moscas de la fruta y, al menos, 1 000 en los seres humanos. Esto no implica que el número de microRNA sea el principal determinante de la complejidad morfológica. Más bien, sugiere que se tiene que aprender más sobre la regulación genética, si se quiere entender la base de la diversidad biológica.
3. Durante la última década más o menos, surgió una nueva área de estudio biológico (la llamada biología de sistemas) que se centra en las formas en que las proteínas trabajan juntas como redes complejas, más que como actores individuales. Un ejemplo muy simple de una red de proteínas es el que se presentó en la figura 2-48. Dado que las células producen miles de diferentes proteínas, con diversos grados de interacción, estos sistemas pueden volverse muy complejos y dinámicos. Un incremento relativamente pequeño de la cantidad de elementos que componen una red, o un aumento en el tamaño y la complejidad de esos elementos, podría aumentar de manera radical la complejidad del sistema y, por tanto, la complejidad de todo el organismo.

Numerosos factores podrían agregarse a esta discusión, pero el punto general está claro: la aparente diferencia en la complejidad

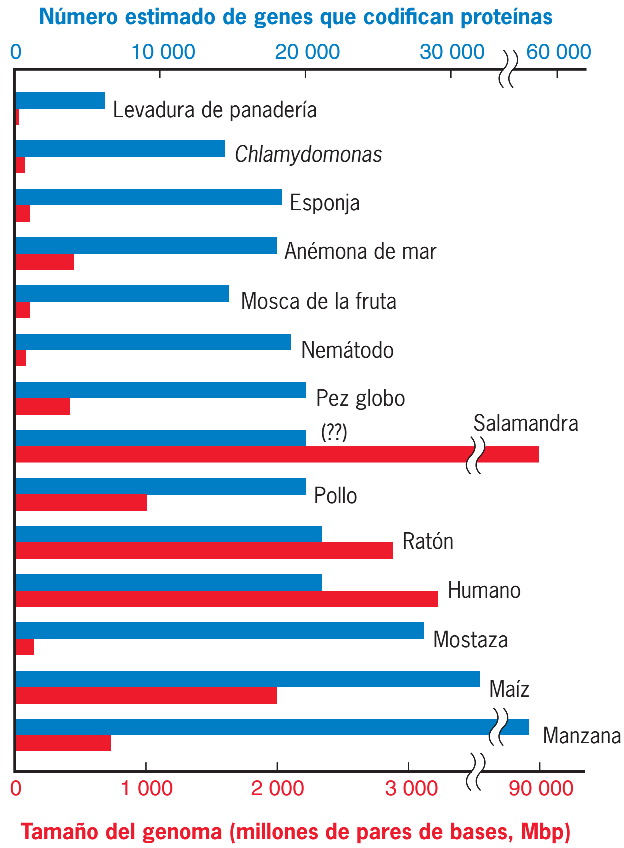



**FIGURA 10-28 Comparaciones genómicas.** Entre los eucariotas cuyos genomas han sido secuenciados, la cantidad de genes que codifican proteínas (barras azules) varía entre alrededor de 6 200 en la levadura y 57 000 en las manzanas; se piensa que los vertebrados poseen unos 20 000. (El alto número de genes en una manzana refleja una duplicación relativamente reciente del genoma completo.) Es interesante en particular la observación de que aparentes incrementos en la complejidad de los organismos no se reflejan en tremendos aumentos en el número de genes. Por ejemplo, ni 1) la transición de eucariotas unicelulares, como las *Clamydomonas*, a los animales multicelulares más simples, las esponjas, ni 2) la transición de los invertebrados a los vertebrados, va acompañada de importantes cambios en el número de genes codificadores de proteínas. Mientras que el número estimado de genes codificadores de proteínas varía en un rango modesto entre eucariotas, la cantidad de DNA en un genoma (barras rojas) varía ampliamente, alcanzando valores de 90 mil millones de pares de bases en algunas salamandras (el número real de genes para estos anfibios se desconoce).

[4] También se puede ver en la figura 10-28 que existe muy poca correlación entre el número de genes que codifican proteínas y la cantidad total de DNA en el genoma. El pez globo, por ejemplo, que tiene aproximadamente el mismo número de genes que otros vertebrados, tiene un genoma que es, más o menos, un octavo del tamaño de su homólogo humano. Se cree que los antepasados del pez globo, como la mayoría de los peces óseos, tenían genomas del tamaño de vertebrados típicos, lo que demuestra que el DNA "en exceso" se puede perder en un linaje a lo largo del tiempo evolutivo. En el otro extremo del espectro del pez globo, el genoma de ciertas salamandras tiene unas 30 veces el tamaño del genoma humano. Los contrastes en el tamaño del genoma entre los vertebrados reflejan una notable diferencia en el contenido de DNA no codificante, en gran medida repetitivo. El significado evolutivo de estas diferencias no está claro.

entre diferentes grupos de organismos multicelulares tiene que ver menos con una cuestión de cantidad de información genética en el genoma de un organismo, que con la forma en que esa información se pone en uso.

**REPASO**

1. ¿Cuántos genes están contenidos en el genoma humano? ¿Por qué los investigadores encontraron tan sorprendente este número?
2. ¿Qué factores adicionales, fuera del número de genes, podrían contribuir a la complejidad de los organismos?

## 10.13 Genómica comparada: "si se conserva, debe ser importante"

Considere los siguientes hechos: 1) la mayoría del genoma se compone del DNA que reside entre los genes, y, por tanto, representa el DNA intergénico, y 2) cada uno de los, aproximadamente, 21 000 genes que codifican proteínas en los seres humanos está formado, en gran parte, por porciones no codificantes (DNA intrónico). Tomados en conjunto, estos hechos indican que la porción que codifica proteínas en el genoma representa un porcentaje notablemente pequeño del DNA total (estimado en alrededor de 1.5%). La mayoría de los DNA intergénicos e intrónicos del genoma no contribuye a la supervivencia y capacidad reproductiva de un individuo, por lo que no hay presión selectiva para mantener su secuencia sin cambios. Como resultado, la mayoría de las secuencias intergénicas e intrónicas tienden a cambiar rápidamente, a medida que los organismos evolucionan. En otras palabras, estas secuencias tienden a no ser conservadas. En contraste, esos segmentos del genoma que codifican secuencias de proteínas o contienen secuencias reguladoras que controlan la expresión de genes (véase figura 12-44) están sujetos a selección natural. La selección natural tiende a eliminar individuos cuyo genoma contiene mutaciones en estos elementos funcionales.[5] Como resultado, estas secuencias tienden a ser conservadas. De estos comentarios se desprende que la mejor forma de identificar secuencias funcionales es comparar los genomas de diferentes tipos de organismos.

A pesar del hecho de que los seres humanos y los ratones no han compartido un ancestro común durante unos 75 millones de años, las dos especies comparten genes similares, que tienden a agruparse en un patrón muy semejante. Por ejemplo, el número y el orden de los genes de globina humanos representados en la figura 10-24 son básicamente similares a los encontrados en un segmento de DNA en el genoma del ratón. Por consiguiente, es posible alinear las regiones correspondientes de los genomas del ratón y humano. El cromosoma humano número 12, por ejemplo, está compuesto de una serie de segmentos, en la que cada segmento corresponde aproximadamente a un bloque de DNA de un cromosoma de ratón. Se indica el número de cromosoma de ratón que contiene cada bloque.

[5] Se pueden reconocer dos lados opuestos de la selección natural. La selección purificadora o negativa actúa para mantener (conservar) secuencias con funciones importantes, debido a que los cambios reducen la probabilidad de que el individuo sobreviva y se reproduzca. Estas regiones del genoma evolucionan más lentamente que las secuencias no funcionales, cuyo cambio no tiene ningún efecto sobre el físico del individuo y no está sujeto a selección natural (se dice que dichas secuencias evolucionan de forma neutral). Por el contrario, la selección positiva o darwiniana promueve la especiación y la evolución a través de la selección de cambios en secuencias que hace que los individuos se adapten mejor a su entorno y, por tanto, tengan más probabilidades de sobrevivir y reproducirse. Estas regiones evolucionan con más rapidez que los segmentos no funcionales.



Cromosoma humano 12

Incluso un examen rápido de este dibujo de un cromosoma humano revela los cambios drásticos en la estructura cromosómica que ocurren cuando la evolución genera nuevas especies en el tiempo. Los bloques de genes que están presentes en el mismo cromosoma en una especie pueden separarse en diferentes cromosomas en una especie posterior. Con el tiempo, el número de cromosomas puede aumentar o disminuir a medida que los cromosomas se separan o se fusionan. Una estimación sugiere que aproximadamente 180 eventos de ruptura y fusión han tenido lugar en el linaje de ratones y seres humanos, desde el momento en que estos dos mamíferos del presente compartieron un antepasado común. Tomados por sí mismos, los cambios en las posiciones de los genes tienen muy poco efecto sobre los fenotipos de los organismos, pero proporcionan una huella visual clara del proceso evolutivo.

Cuando los segmentos homólogos del genoma humano y del ratón se alinean sobre la base de sus secuencias de nucleótidos, se encuentra que alrededor de 5% de las secuencias de DNA están altamente conservadas entre las dos especies. Este es un porcentaje mucho más alto del que se hubiera esperado al combinar las regiones codificantes de proteínas conocidas y las regiones reguladoras de genes (que en conjunto representan aproximadamente 2% del genoma). Si se asume uno de los principios más importantes de la evolución molecular: "si se conserva, debe ser importante", entonces estos estudios dicen que partes del gen que se suponía que consistían en secuencias "inútiles", en realidad tienen funciones importantes no identificadas. Algunas de estas regiones indudablemente codifican RNA que tienen varias funciones reguladoras (discutidas en las secciones 11.12 y 11.13). Otras, es posible, tienen "funciones cromosómicas" en lugar de "funciones genéticas". Por ejemplo, estas secuencias conservadas podrían ser importantes para el emparejamiento cromosómico antes de la división celular. Cualquiera que sea su función, estos elementos genómicos a menudo se ubican a grandes distancias del gen más cercano e incluyen algunas de las secuencias más conservadas jamás descubiertas, exhibiendo una identidad virtual entre los genomas humanos, de rata y de ratón.

Al comparar los tramos del genoma entre dos especies distantes, como las del humano y el ratón, se pueden identificar aquellas regiones que se han conservado durante decenas de millones de años. Sin embargo, este enfoque no identificará secuencias funcionales en el genoma humano que tengan un origen evolutivo más reciente. Esto podría incluir, por ejemplo, genes que están presentes en los seres humanos y ausentes en ratones, o regiones reguladoras que han cambiado su secuencia a lo largo de la evolución de los primates, para permitirles unirse a nuevas proteínas reguladoras. Se está llevando a cabo un esfuerzo concertado (llamado Proyecto ENCODE) para identificar todos los elementos funcionales presentes en el genoma humano. Desafortunadamente, se carece de los conocimientos necesarios para reconocer muchos de estos elementos funcionales, lo que confunde de manera obvia la tarea. Un punto ha quedado claro a partir de estudios recientes: una proporción significativa de secuencias funcionales de DNA está evolucionando siempre y, por tanto, no está altamente conservada. En otras palabras, si se restringe la búsqueda a secuencias conservadas, se corre el riesgo de perder muchos de los elementos funcionales más importantes en el genoma.

**REPASO**

1. ¿Qué proporción del genoma humano es conocida por codificar las proteínas? ¿Qué funciones podrían ejercer las regiones no codificantes conservadas?

## 10.14 Base genética del "ser humano"

Al estudiar las secuencias conservadas, se aprende de las características que el ser humano comparte con otros organismos. Si se quiere entender mejor la evolución biológica única del ser humano, hay que mirar más de cerca en aquellas partes del genoma que lo distinguen de otros organismos. Los chimpancés son los parientes vivos más cercanos del humano, comparten un ancestro común hace tan sólo 5-7 millones de años. Se pensó que un análisis detallado de las diferencias en la organización de los genes y las secuencias de DNA entre los chimpancés y los seres humanos podría decir mucho sobre la base genética de las características evolutivas recientes que hacen únicos a los seres humanos, como caminar erguido, el uso avanzado de herramientas y el lenguaje. Estas últimas características pueden rastrearse hasta el cerebro humano, que tiene un volumen de alrededor de 1 300 $cm^3$ —casi cuatro veces más que un chimpancé.

El borrador del genoma del chimpancé se informó en 2005. En general, los genomas del chimpancé y los de los seres humanos difieren aproximadamente 4%, lo que equivale a decenas de millones de diferencias, un nivel de divergencia que es, de manera considerable, mayor de lo esperado a partir de los estudios preliminares. Si bien parte de esta divergencia se debe a cambios de un solo nucleótido entre los dos genomas, la mayor se atribuye a diferencias más grandes, como eliminaciones y duplicaciones segmentarias (véase nota al pie, página 390).

Los investigadores han podido identificar cientos de genes en el linaje humano que evolucionan más rápido que la tasa de fondo (o neutra), presumiblemente en respuesta a la selección natural. Sin embargo, no está claro cuál de estos genes, si es que existe alguno, contribuye a "hacernos seres humanos". Algunos de los genes de evolución más rápida codifican proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica (es decir, factores de transcripción). Estos son, precisamente, los tipos de genes que se espera que generen grandes diferencias fenotípicas, porque pueden afectar la expresión de un gran número de otros genes. De hecho, se presume que las diferencias entre los factores de transcripción del chimpancé y los seres humanos son las responsables de muchas de las divergencias en la expresión de diversas proteínas cerebrales. Esto se puede ilustrar mediante un examen más detallado de un factor de transcripción cerebral específico llamado FOXP2.

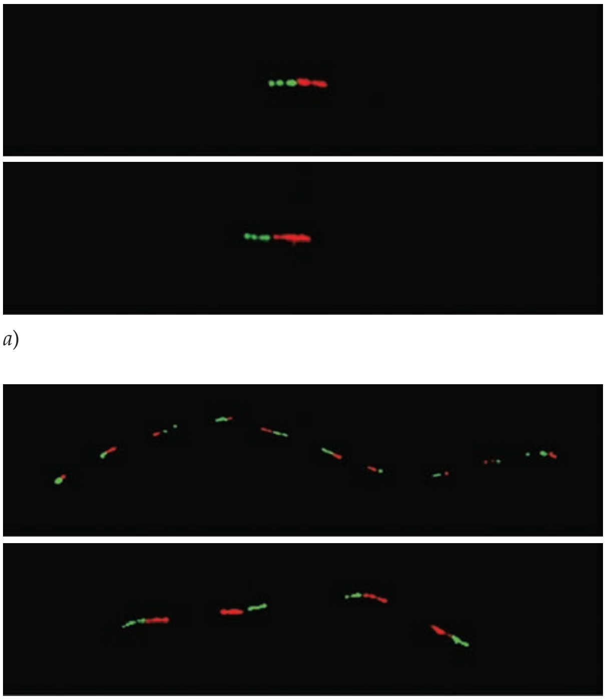
Una comparación de la proteína FOXP2 entre los seres humanos y los chimpancés muestra dos diferencias de aminoácidos que han aparecido en el linaje humano desde el momento de la separación de nuestro último antepasado común. Para evaluar los efectos de estas sustituciones de aminoácidos en la función de FOXP2, se diseñaron células neuronales humanas que carecían de su propio gen *FOXP2*, para expresar la versión humana o chimpancé del gen. Estas dos poblaciones celulares se estudiaron luego en un cultivo, con el objetivo de evaluar los efectos de las versiones alternativas del factor de transcripción. Se encontró que más de 100 genes blanco eran significativamente regulados positiva o negativamente en las células que expresan el gen *FOXP2* humano, en comparación con aquellas que expresaban la versión chimpancé del factor de transcripción. Lo que hace que el gen *FOXP2* sea tan interesante es que las personas con mutaciones en el gen sufren de un severo trastorno del lenguaje. Entre otras deficiencias, las personas con este trastorno son incapaces de realizar los movimientos musculares finos de los labios y la lengua que se requieren para participar en la comunicación oral. Los cálculos sugieren que los cambios en este "gen del habla" que lo distinguieron de la versión del chimpancé se hicieron "fijos" en el genoma humano en los últimos 120 000 a 200 000 años, el tiempo en que se piensa que surgieron los seres humanos modernos. (Se dice que una alteración en la secuencia del DNA es *fija*, si está presente en, prácticamente, todos los miembros de la especie.) Estos hallazgos sugieren que los cambios en el gen *FOXP2* pueden haber tenido una función importante en la evolución y desarrollo del habla humana.

Se han descrito otras diferencias genómicas entre los chimpancés y los seres humanos, incluidas las alteraciones en ciertos genes que parecen afectar el desarrollo del cerebro. Uno de estos genes, llamado *SRGAP2*, se sabe que se ha duplicado en los seres humanos, pero no en los chimpancés u otros primates. Además de una versión parental completa del *SRGAP2*, los seres humanos tienen tres copias truncadas adicionales, resultantes de los eventos de duplicación genética parcial que se produjeron entre hace 1 y 3.5 millones de años. Experimentos que utilizan ratones y modelos de cultivo celular han indicado que la expresión de una de estas duplicaciones truncadas, llamada *SRGAP2C*, es capaz de dimerizarse con la proteína parental SRGAP2 y desactivar su actividad. Como resultado, las neuronas mostraron un aumento drástico en el número de espinas dendríticas (una parte de la neurona que recibe mensajes de las neuronas circundantes), que pudo haber contribuido al tamaño del cerebro humano en relación con el de nuestros parientes primates.

Otro gen de interés codifica la enzima amilasa, que digiere el almidón, presente en la saliva. Los chimpancés tienen una dieta relativamente baja en almidón y tienen una copia del gen *AMY1* en su genoma (**FIGURA 10-29*a***). Durante la evolución de los seres humanos, ha habido una selección aparente para un mayor número de copias del gen *AMY1*, que ha resultado en una mayor concentración de la enzima amilasa en la saliva humana. Se podría haber predicho que un aumento en el nivel de amilasa se habría logrado durante la evolución por un aumento en el nivel de expresión del único gen *AMY1* existente en el genoma, pero en este caso particular, ha resultado de la duplicación de genes. Como se observa en la **FIGURA 10-29*b***), y se discute en la siguiente sección, la cantidad de copias del gen *AMY1* entre los seres humanos es variable. De hecho, el número de copias de este gen tiende a ser mayor en poblaciones humanas que ingieren mayores cantidades de almidón en su dieta.

Una de las preguntas más interesantes en el área de la evolución humana se refiere a las posibles relaciones entre los seres humanos modernos (es decir, *Homo sapiens*) y los de otras especies "humanas" (es decir, miembros arcaicos del género *Homo* que se extinguieron). Los seres humanos que pudieron ser indistinguibles de nuestra especie actual, o sea, humanos modernos desde el punto de vista anatómico, se cree que evolucionaron primero en África unos 200 000 años atrás. Pero los *Homo sapiens* no son los únicos miembros del género *Homo* que ha habitado la Tierra en los últimos 200 000 años. De hecho, otros dos miembros del género, los neandertales y los recientemente descubiertos denisovanos eran residentes de Europa hace tan poco tiempo como 35 000 años, miles de años después de la llegada de los humanos modernos al continente. Se cree que las tres especies compartieron algunas de las mismas regiones en el Medio Oriente en un periodo aún más temprano. Dado que estas especies habitaron áreas similares y eran muy semejantes anatómicamente, los paleontólogos se han preguntado si 1) las diferentes especies se cruzaron o 2) los seres humanos modernos simplemente reemplazaron a otras especies sin cruzarse. Una respuesta a esa pregunta requiere información detallada sobre las diferencias en las secuencias de DNA entre los seres humanos modernos y los arcaicos.

A finales de la década de 1990, los investigadores desarrollaron técnicas cada vez más sofisticadas para aislar y secuenciar fragmentos de DNA mitocondrial (mtDNA, *mitochondrial DNA*) a partir de restos fósiles de los neandertales. El DNA mitocondrial es más fácil de analizar desde los fósiles que el DNA nuclear, porque cada célula contiene muchas copias del genoma mitocondrial, y es mucho más pequeña en tamaño. Los resultados de estos estudios sugirieron que la secuencia de mtDNA de los neandertales era lo suficientemente diferente de la del mtDNA humano moderno, como para concluir que los neandertales se extinguieron sin aportar material genético al genoma mitocon-



a)

b)

**FIGURA 10-29 Duplicación del gen de amilasa durante la evolución humana.** En los resultados representados aquí, un par de cromosomas homólogos de un chimpancé *a*) o un ser humano *b*) se ha hibridado con sondas de color rojo y verde que se unen a diferentes porciones del gen *AMY1*. Este gen codifica la enzima amilasa salival que digiere el almidón. Los números de copias del gen *AMY1* en cada cromosoma se revelan por la cantidad de veces que se repiten las sondas fluorescentes. El chimpancé tiene una copia del gen *AMY1* en cada cromosoma (es decir, una copia por genoma), mientras que los seres humanos tienen varias copias. La cantidad de copias del gen varía dentro del genoma humano, como se ilustra aquí, por el hecho de que uno de los dos cromosomas homólogos de este individuo tiene 4 copias del gen y el otro cromosoma homólogo tiene 10 copias. Este es un ejemplo de una variación en el número de copias (página 399). Por otra parte, el número de copias del gen *AMY1* en los genomas de una población humana determinada tiende a correlacionarse con la cantidad de almidón en la dieta de esa población. Esta correlación sugiere con fuerza que el número de copias del gen *AMY1* ha sido influido por la selección natural.

FUENTE: Tomada de George H. Perry, *et al*. Cortesía de Nathaniel J. Dominy. *Nature Gen* 2007;39:1257. Reproducido con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

drial humano moderno. En otras palabras, las dos especies no se cruzaron y, además, no compartieron un ancestro común durante, al menos, 300 000 años.

En 2010, Svante Pääbo y sus colegas del Instituto Max Planck, en Alemania, reunieron una secuencia relativamente completa del genoma *nuclear* neandertal y concluyeron que los seres humanos modernos y los genomas del Neanderthal son idénticos en un 99.84%. Los neandertales, por ejemplo, tenían el mismo alelo *FOXP2* (discutido anteriormente) que los seres humanos modernos, lo que dio a entender que ellos también tenían habilidades de lenguaje verbal. Por otra parte, una comparación detallada de los genomas nucleares de una serie de fósiles neandertales diferentes y los de varios seres humanos actuales sugirió que aproximadamente de 1 a 4% del DNA de los europeos y asiáticos modernos se deriva de una fuente neandertal. Muchos de los genes en el DNA derivados del Neanderthal contribuyen al reconocimiento de patógenos del sistema inmunológico. La adquisición de estos genes puede haber servido para proteger a los seres humanos recién llegados de enfermedades a las que los neandertales habían estado previamente expuestos. Por el contrario, los genomas de los africanos no muestran evidencia de una contribución de los neandertales. De acuerdo con estos datos, los seres humanos modernos y los neandertales se cruzaron en algún momento después de que los humanos modernos abandonaron África y antes de que se extendieran por Europa y Asia. Los datos recientes del genoma completo de los neandertales y un denisovano han confirmado la presencia de un bajo nivel de cruzamiento entre las tres especies *Homo* durante la era del Pleistoceno tardío. Estos hallazgos han establecido el escenario para algunas especulaciones muy interesantes sobre el árbol filogenético humano. Según algunos investigadores que prevén una cantidad de especies humanas compartiendo el planeta en los últimos 100 000 años, nuestra población actual puede describirse como “los últimos seres humanos de pie”.

Esta sección se ha centrado en las diferencias genómicas entre los seres humanos y otros primates, debido a que ese es el tema del presente capítulo. Probablemente sea evidente, por la naturaleza limitada de esta discusión, que los investigadores aún no han avanzado mucho en la identificación de la base genética del “ser humano”. Muchos de ellos creen que, en este campo, se ha centrado demasiada atención en los cambios en las secuencias de codificación de proteínas. En su lugar, argumentan que los cambios en la regulación de la expresión génica han desempeñado una función principal en la evolución humana, pero es difícil determinar cuáles de estos cambios tienen una importancia real.

**REPASO**

1. ¿Qué tan similar es el genoma del ser humano y el del chimpancé? Proporcione ejemplos de cambios genéticos que pueden haber llevado a diferencias en el fenotipo entre los seres humanos y los chimpancés.

## 10.15 Variación genética dentro de la población de la especie humana

Nadie más en el mundo se ve exactamente como usted porque nadie más, que no sea un gemelo idéntico, tiene la misma secuencia de DNA en todas las partes de su genoma. El genoma humano se secuenció por el Proyecto del Genoma Humano, que se derivó de un solo ser humano masculino. Desde la finalización de esa secuencia, se centró la atención en cómo la secuencia del DNA varía dentro de la población humana. Los **polimorfismos genéticos** son sitios en el genoma que varían entre diferentes individuos. El término por lo general se refiere a una genética variante que aparece en, siquiera, 1% de la población de una especie. El concepto de polimorfismos genéticos comenzó con el descubrimiento en 1900, por un médico austríaco, Karl Landsteiner, de que las personas podrían tener, al menos, tres tipos diferentes de sangre, A, B u O. Como se analiza en la figura 4-12, el grupo sanguíneo ABO es el resultado de que los miembros de la población tengan alelos diferentes de un gen que codifica una enzima de transferencia de azúcar.

### Variación en la secuencia del DNA

El tipo más común de variabilidad genética en los seres humanos aparece en los sitios en el genoma donde se encuentran diferencias de un solo nucleótido entre diferentes miembros de la población. Cuando está presente en, por lo menos, 1% de la población, estos sitios se llaman **polimorfismos de nucleótidos simples** (**SNP**, *single nucleotide polymorphisms*). La gran mayoría de los SNP (pronunciado “snips”) aparece como dos alelos alternativos, como A o G. Se cree que la mayor parte de los SNP surgieron por una única mutación durante el curso de la evolución humana y que son compartidos por individuos a través de la descendencia

común. Los SNP comunes han sido identificados al comparar secuencias de DNA de los genomas de cientos de individuos de diversas poblaciones étnicas. En promedio, dos genomas humanos seleccionados al azar tienen alrededor de 3 millones de nucleótidos simples diferentes entre ellos, o uno cada mil pares de bases. Aunque esto podría parecer un número grande, significa que los seres humanos son, en promedio, 99.9% similares entre sí con respecto a la secuencia de nucleótidos.

Proyectos recientes a gran escala que utilizan métodos de secuenciación de próxima generación, como el proyecto Genoma 1 000 (publicó los genomas completos de 1 092 individuos de poblaciones de diferentes áreas geográficas), han informado un número sorprendentemente alto de variantes raras de nucleótidos únicos (SNV, *singlenucleotide variants*) que aparecen en menos de 0.5% de la población. Las estimaciones actuales sugieren que cada persona alberga más de 100 variantes raras de un nucleótido único en su exoma (la porción del genoma que codifica las proteínas). Los investigadores han hecho hipótesis de que la gran cantidad de SNV observada en las poblaciones humanas se debe a un explosivo crecimiento de la población alrededor de tres órdenes de magnitud de más de 400 generaciones, eso es tan reciente que la selección natural no ha tenido tiempo de "eliminar" las mutaciones deletéreas. Es este gran cuerpo de variación genética lo que se piensa que sea, en gran parte, responsable de la variabilidad fenotípica y la vulnerabilidad a las enfermedades que se observa entre los seres humanos. El impacto de la variación de la secuencia del genoma humano en la práctica de la medicina es discutido en la sección "Perspectiva humana" de la página 400.

## Variación estructural

Como se ilustra en la **FIGURA 10-30*a***), los segmentos del genoma pueden cambiar como resultado de duplicaciones, deleciones, inserciones, inversiones (cuando una pieza de DNA existe en una orientación inversa) y otros eventos. Estos tipos de cambios por lo general involucran segmentos de DNA que varían de cientos a millones de pares de bases de longitud. Debido a su tamaño relativamente grande, estos tipos de polimorfismos se llaman *variantes estructurales*, y se está empezando a comprender la extensión e importancia de su presencia.

Se conoce, desde los primeros días del análisis microscópico del cromosoma, que no todas las personas sanas tienen estructuras cromosómicas idénticas. En la figura 10-30*b* se muestra un ejemplo de una inversión cromosómica, cuya existencia se ha conocido por más de 30 años. Estudios recientes han revelado que las variantes estructurales de tamaño intermedio, aquellas que son demasiado pequeñas para ser vistas bajo el microscopio y demasiado grandes para detectarse fácilmente por los análisis convencionales de secuencias, son mucho más comunes de lo que se pensó. Según una estimación, un genoma humano típico lleva aproximadamente 1 000 variantes estructurales, que varían en longitud desde unas 500 bases a 1.3 millones de bases (Mb). Aunque las estimaciones varían de manera considerable, es evidente que la fracción del genoma (es decir, el número total de pares de bases) afectado por la variación estructural es mayor que la del afectado por los SNP. Como resultado, la variación estructural tiene un efecto significativo sobre la variación fenotípica entre los seres humanos.

## Variación del número de copias

Como se discutió en la figura 10-19, la técnica de huellas dactilares de DNA depende de las diferencias en la longitud de las secuencias de minisatélites, que a su vez dependen del número de copias de la secuencia que está presente en sitios particulares en los cromosomas. Este es un ejemplo de una *variación en el número de copias* (o CNV, *copy number variation*). Hallazgos recientes han revelado que la CNV mucho más grande (1 kb) también es común en la población humana, afectando aproximadamente a 10-15% del genoma, incluyendo un gran número de genes que codifican

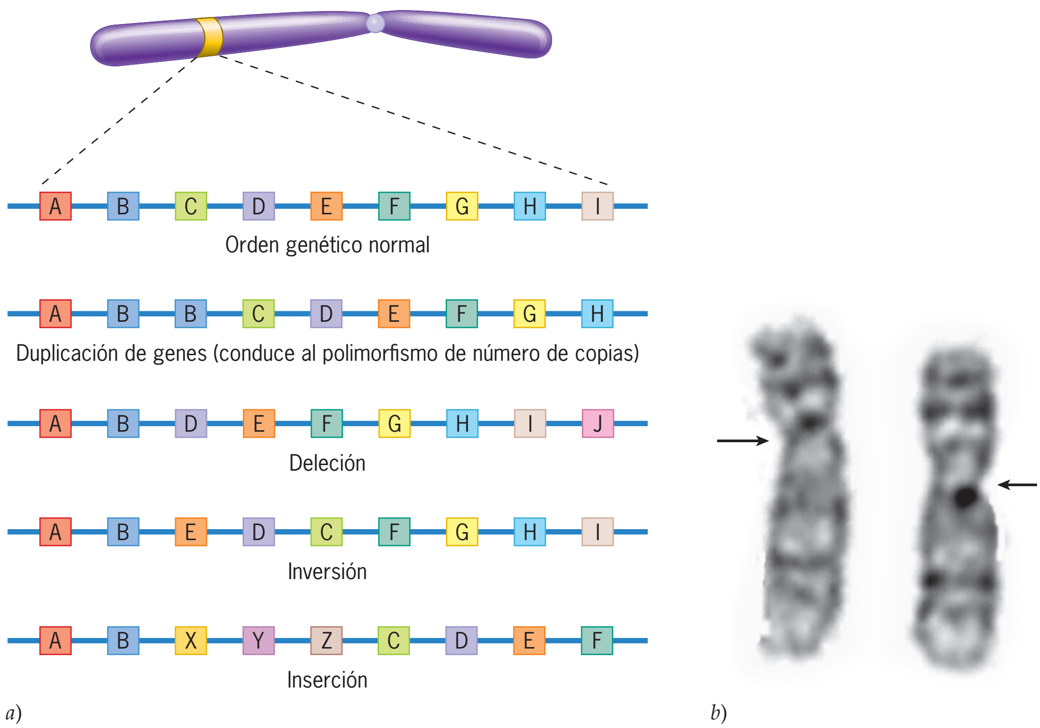



**FIGURA 10-30 Variantes estructurales.** *a*) Representación esquemática de los principales tipos de polimorfismos genómicos que implican un segmento significativo de un cromosoma (p. ej., de miles de pares de bases). La mayoría de estos polimorfismos son demasiado pequeños para ser detectados por el examen microscópico de los cromosomas, pero se descubren cuando se determina el número y/o la ubicación cromosómica de los genes individuales. *b*) A la izquierda hay un cromosoma humano normal #9 y, a la derecha, un cromosoma #9 que contiene una gran inversión que incluye el centrómero del cromosoma (flecha). Esta inversión, que es claramente visible a través del microscopio, está presente en 1-3% de la población.

FUENTE: De Charles Lee. *Nature Gen* 2005;37:661. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited.

proteínas. Esta CNV de gran tamaño es un tipo de variación estructural que resulta de una duplicación o deleción de un segmento de DNA. Debido a tal CNV, muchos de los seres humanos usan copias adicionales de uno o más genes que codifican proteínas fisiológicas importantes. Las copias adicionales de los genes generalmente se asocian con la sobreproducción de una proteína, que puede interrumpir el delicado equilibrio bioquímico que existe dentro de una célula. Se encuentra, por ejemplo, que un número significativo de personas que desarrollan la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano posee copias adicionales del gen *APP*, que codifica la proteína que, se piensa, sea responsable de la enfermedad (sección 2.13). Aunque el tema es controvertido, existe un consenso cada vez mayor entre los investigadores de que los individuos con autismo o esquizofrenia tienen un número de CNV más grande de lo normal en sus genomas. Algunos de los genes afectados por esta CNV están involucrados en la sinapsis y otros procesos neurológicos. En algunos casos, las extracciones de un gen pueden ser beneficiosas, como lo ilustra la duplicación repetida del gen de la amilasa (*AMY1*), que se ha encontrado en ciertas poblaciones humanas que tienen un alto contenido de almidón en su dieta (figura 10-29*b*). En la figura 10-29*b*) también se proporciona un excelente ejemplo de una CNV, en el sentido de que muestra el número de genes *AMY1* en ambas copias de los cromosomas homólogos de una persona. Se puede observar que un cromosoma contiene sólo cuatro copias del gen AMY1, mientras que el cromosoma homólogo contiene 10 copias del gen.



**REPASO**

1. Describa tres tipos diferentes de polimorfismos genéticos en los seres humanos. ¿Cuál es el más común?

## 10.16 PERSPECTIVA HUMANA

### Aplicación de análisis genómicos a la medicina

En las últimas décadas, se han identificado más de mil genes como la causa de enfermedades hereditarias raras. En la mayoría de los casos, el gen responsable de la enfermedad se identificó a través de estudios tradicionales de vinculación genética. Dichos estudios comienzan por localizar a varias familias, cuyos miembros exhiben una frecuencia desproporcionadamente alta de una enfermedad particular. El desafío inicial es determinar qué región del genoma es compartida por todos los miembros afectados de la familia. Una vez que se identifica una región unida al gen de la enfermedad, puede aislarse el DNA de ese segmento y reconocerse el gen mutante. Este tipo de enfoque genético es muy adecuado para la identificación de genes que tienen penetrancia muy alta, es decir, genes cuya forma mutante prácticamente garantiza que el individuo estará afectado por el trastorno. El gen mutante responsable de la enfermedad de Huntington (sección 10.9), por ejemplo, exhibe una penetrancia muy alta. Además, ningún otro defecto genético en el genoma causa esta enfermedad. Se dice que los genes que muestran muy alta penetrancia siguen la herencia mendeliana, y se han identificado más de 3 000 de esos genes.

La mayoría de las enfermedades comunes que afectan a nuestra especie, como cáncer, insuficiencia cardiaca, enfermedad de Alzheimer, diabetes, asma, autismo, depresión y varias enfermedades relacionadas con la edad, tienen un componente genético, lo que quiere decir que muestran, al menos, cierta tendencia a ser hereditarias. Pero, a diferencia de los trastornos hereditarios, como la enfermedad de Huntington, no existe un solo gen que esté claramente relacionado con la enfermedad. En cambio, es probable que numerosos genes afecten el riesgo de la enfermedad, ya que cada uno de ellos contribuye, sólo en pequeña medida, a la probabilidad general de desarrollar el trastorno. Además, el desarrollo del trastorno a menudo está influido por factores no genéticos (es decir, ambientales). La probabilidad de desarrollar diabetes, por ejemplo, aumenta mucho en las personas que tienen un sobrepeso importante, y la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón aumenta por fumar. Uno de los objetivos de la comunidad de investigación médica es identificar los genes que favorecen el desarrollo de estas enfermedades comunes, pero genéticamente complejas.

Debido a su baja penetrancia, la mayoría de los genes que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades comunes no pueden identificarse mediante estudios de vinculación familiar.[a] En cambio, dichos genes se identifican mejor mediante el análisis de la incidencia de la enfermedad en grandes poblaciones. Para llevar a cabo este tipo de investigación, los estudiosos comparan los genotipos de individuos que tienen la enfermedad en cuestión, con individuos de un origen étnico similar que no están afectados. El objetivo es descubrir una *asociación* (o correlación) entre una condición particular, como la diabetes, y los polimorfismos genéticos comunes. El valor potencial de este enfoque se ilustra con el descubrimiento, a principios de la década de 1990, de una fuerte asociación entre un alelo común del gen que codifica la lipoproteína ApoE y la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Se descubrió en estos estudios que las personas que tienen, al menos, una copia del alelo *APOE4* del gen son mucho más propensas a desarrollar esta enfermedad neurodegenerativa incapacitante que las personas que carecen del alelo. Estos hallazgos han abierto una importante rama de investigación en la relación entre el metabolismo del colesterol, la salud cardiovascular y la enfermedad de Alzheimer.

Como su nombre lo indica, los **estudios de asociación de genoma completo** (**GWAS, *genome-wide association studies***) buscan asociaciones entre un estado de enfermedad y un polimorfismo que puede estar ubicado en cualquier parte del genoma. Esto requiere determinar la secuencia de nucleótidos de grandes partes del genoma de todos los sujetos que participan en el estudio. Los GWAS se basan en la premisa de que las enfermedades comunes están causadas por variantes comunes, es decir, variantes presentes en 1% o más de la población. Si una variante causante de enfermedad está presente en menor frecuencia, no se detectará en estos tipos de estudios. Como se señaló antes, los tipos más comunes de variabilidad genética en los seres humanos son las diferencias de nucleótido simple (SNP),

[a] No todos los genes implicados en enfermedades comunes tienen una baja penetrancia. La enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, aparece con alta frecuencia en personas que tienen ciertos alelos APP (sección 2.13) y el cáncer de mama se observa con alta frecuencia en personas que tienen ciertos alelos *BRCA* (sección 16.8). Pero estos tipos de polimorfismos raros de alta penetrancia no son factores importantes en el desarrollo de la gran mayoría de los casos de cualquiera de estas enfermedades.

que se extienden de manera casi uniforme en todo el genoma. Es probable que muchos de los SNP que cambian la especificidad de codificación de un gen, o la regulación de la expresión de un gen, desempeñen una función importante en la susceptibilidad del individuo a enfermedades complejas. A medida que el costo de la genotipificación de las muestras de DNA humano ha disminuido drásticamente, los investigadores han comenzado a escanear los genomas de un gran número de personas, para identificar SNP que aparecen con mayor frecuencia en personas afectadas por una enfermedad particular que en individuos sanos. Incluso si los SNP identificados no son directamente responsables de la enfermedad, sirven como marcadores genéticos para un *locus* cercano que podría ser responsable. Estos principios están bien ilustrados por un estudio histórico de asociación del genoma publicado en 2005 sobre la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, *age-related macular degeneration*), que es la principal causa de ceguera en los ancianos. En un inicio, los investigadores compararon 96 casos de AMD con 50 controles, buscando una asociación de la enfermedad con más de 100 000 SNP que habían sido genotipificados en los sujetos. Descubrieron una fuerte asociación entre individuos con la enfermedad y un SNP común presente dentro del intrón (sección no codificante) de un gen llamado *CFH* que está involucrado en la inmunidad y la inflamación. Las personas homocigóticas para este SNP tenían un riesgo 7.4 veces mayor de tener la enfermedad. Una vez que fijaron esta región del genoma como asociada a la AMD, secuenciaron todo el gen *CFH* en 96 individuos. Descubrieron que el SNP que habían identificado estaba estrechamente relacionado con un polimorfismo dentro de la región codificante del gen *CFH* que colocaba una histidina en un sitio particular en la proteína. Otros alelos de la proteína CFH que no estaban asociados con un riesgo de AMD tenían una tirosina en esta posición. Estos hallazgos proporcionaron evidencia adicional de que la inflamación es un factor subyacente en el desarrollo de la AMD y señaló un objetivo claro en la búsqueda de tratamientos de la enfermedad.

Se ha llevado a cabo una gran cantidad de GWAS en años anteriores. En muchos de estos estudios, los genomas de miles personas han sido escrudiñados, y los resultados han sido confirmados en análisis independientes de casos separados y poblaciones de control. Estos estudios se han vuelto prácticos con la disponibilidad de chips producidos comercialmente, que albergan un millón o más fragmentos de DNA que contienen los SNP más comunes en la población humana. Los investigadores pueden incubar el chip con una muestra de DNA para ser probado y determinar rápidamente cuál de los posibles SNP está presente en cada ubicación genómica en ese DNA de la persona. Una vez que un SNP particular se identifica como asociado con una enfermedad particular, los investigadores pueden buscar un gen probable en esa región del genoma que es responsable de la asociación (véase la discusión a continuación sobre los haplotipos). Por otra parte, los datos generados por una serie de diferentes estudios sobre una enfermedad en particular pueden agruparse, lo que aumenta el tamaño de la muestra y les da a los investigadores mayor poder estadístico para identificar variantes causantes de enfermedades. Como resultado de estos GWAS, ahora se tienen listas de genes, así como sitios no codificadores que regulan la expresión génica, para los cuales ciertos alelos o variantes aumentan la probabilidad de que un individuo desarrollará varias enfermedades, incluyendo enfermedades del corazón, enfermedad de Crohn, diabetes tipos 1 y 2, y varios tipos de cáncer.

Cuando los investigadores comenzaron estos estudios de asociación, se esperaba que revelaran nuevos conocimientos sobre la base subyacente de enfermedades comunes mediante el descubrimiento de genes que previamente no se sospechaba que estuvieran involucrados en enfermedades particulares. Los productos de dichos genes finalmente pueden convertirse en blanco de nuevas vías de la terapia farmacológica, al igual que la identificación de la importancia del gen de la HMG CoA reductasa y el gen del receptor LDL en la enfermedad de la hipercolesterolemia familiar (sección 8.18) condujeron al desarrollo de las estatinas que reducen el colesterol. Si bien estos estudios de asociación genética aún no han llevado a la aparición de nuevos medicamentos, se han descubierto importantes mecanismos y vías involucradas en el desarrollo de numerosas enfermedades. Para citar solo un ejemplo, varios de los alelos de susceptibilidad que contribuyen a la diabetes tipo 2 codifican proteínas que funcionan en las células secretoras de insulina del páncreas, en las que se renueva la atención acerca de la disfunción de estas células en el desarrollo de dicha enfermedad. (Los lectores interesados en examinar los resultados de estos estudios pueden encontrarlos en el sitio amigable para el usuario www.snpedia.com)

A pesar de que los GWAS han mostrado que cientos de variantes genéticas comunes contribuyen a docenas de enfermedades comunes, también han dejado a muchos genetistas clínicos decepcionados. Durante muchos años, se ha sabido el grado en el que la herencia contribuye a la susceptibilidad general de la mayoría de las enfermedades comunes. Esta medida se ha obtenido sobre todo al comparar la incidencia de una enfermedad dada en miembros de la misma familia, en comparación con los miembros de la población general. Cuando se examinan los resultados de los recientes GWAS, la gran mayoría de los "alelos de susceptibilidad" comunes que han sido identificados conllevan sólo un pequeño aumento en el riesgo de desarrollar un enfermedad particular, por lo general menos de 1.5 veces las probabilidades sin el alelo. Si se suma el mayor riesgo que una persona soportaría si llevara todos los alelos de susceptibilidad identificados para una enfermedad particular, como la enfermedad de Crohn o la diabetes tipo 2, no se acerca a representar la contribución que se sabe que la genética desempeña en el desarrollo de esa enfermedad. En otras palabras, hay una gran cantidad de "falta de heredabilidad" que aún no se ha descubierto. Inicialmente se pensó que gran parte de la falta de heredabilidad podría explicarse por variaciones estructurales (página 399), que no están sujetas a la detección en estudios de asociación que dependen de SNP. Sin embargo, como se han desarrollado técnicas para mapear las variantes estructurales en el genoma humano, esta noción ahora también parece poco probable.

Muchos elementos podrían ser responsables del hecho de que la mayoría de los factores de riesgo genéticos para enfermedades comunes aún no hayan sido identificados. Por ejemplo, una gran cantidad de alelos comunes puede contribuir con un riesgo tan pequeño (es decir, tener una penetrancia muy baja) que no se detecta en estos GWAS. Si este resulta ser el caso, entonces la identificación de tales variantes poco penetrantes puede ser de poco valor práctico. En el extremo opuesto de la escala, puede haber un gran número de variantes raras que aumenten significativamente el riesgo de enfermedad (es decir, son moderadamente penetrantes). Sin embargo, debido a que son raras (p. ej., frecuencia de 0.1 a 1%), este grupo de variantes también se habría pasado por alto en los GWAS correspondientes. Otra explicación de gran parte de la falta de heredabilidad es un fenómeno llamado *epistasia*, que describe la observación de que la presencia de un alelo particular en un *locus* genético puede afectar la expresión de un alelo en un *locus* diferente. Dicho de otro modo, los genes pueden interactuar entre sí, y, por tanto, los investigadores pueden tener que considerar el papel de combinaciones específicas de alelos como determinantes de fenotipos particulares. Es bastante difícil determinar los efectos de las variantes individuales en el resultado de una enfermedad particular, sin intentar medir los efectos de las combinaciones de variantes.

A pesar de las dificultades actuales, puede ser posible, un día, determinar si una persona está genéticamente predispuesta a desarrollar una enfermedad particular, con sólo identificar qué nucleótidos están presentes en posiciones clave dentro del ge-

(*continúa*)

noma de esa persona. La información sobre la variación genética también puede proporcionar una indicación en cuanto a cómo las personas reaccionarán a un medicamento en particular, si es probable que les sirva de ayuda o si es posible que desarrollen efectos secundarios serios. Para citar solo un ejemplo, las personas que llevan un alelo con dos SNP específicos en un gen que codifica la enzima TPMT no pueden metabolizar una clase de medicamentos de tiopurina que se usa comúnmente para tratar un tipo de leucemia infantil. Las personas que son homocigotas para este alelo tienen un riesgo muy alto de desarrollar una supresión que amenaza la vida de su médula ósea cuando se tratan con dosis normales de medicamentos de tiopurina. La mayoría de las enfermedades pueden tratarse con una serie de fármacos alternativos, de modo que la selección de medicamentos es un aspecto importante de la práctica de la medicina. La industria farmacéutica espera que los datos de SNP eventualmente conduzca a una era de "terapia farmacológica personalizada", lo que permitiría a los médicos prescribir medicamentos específicos en dosis concretas adaptadas a cada paciente individual, en función de su perfil genético. Esta era puede haber comenzado con la aprobación, por parte de la FDA, de un DNA que contiene un chip que permite a los médicos analizar el DNA de un paciente para determinar qué variantes de dos genes diferentes del citocromo P-450 posee. Estos genes ayudan a determinar la eficacia de una persona para metabolizar varios medicamentos, que van desde analgésicos y antidepresivos, hasta medicamentos sin receta para la acidez estomacal.

El uso de datos de SNP en estudios de asociación representa un desafío formidable, debido a la gran cantidad de estos polimorfismos dentro del genoma. A medida que los investigadores comenzaron a estudiar la distribución de los SNP en diferentes poblaciones humanas, realizaron un sorprendente descubrimiento que ha hecho que los estudios de asociación sean mucho más simples: los grandes bloques de SNP se heredaron juntos como una unidad en el transcurso de la evolución humana reciente. Estos tramos de SNP se cree que han permanecido juntos en el genoma, porque la recombinación genética (es decir, el entrecruzamiento) no ocurre al azar a lo largo del DNA, como se sugirió en la discusión de mapeo de genes en la página 371. En cambio, hay segmentos cortos de DNA (1-2 kb), en los cuales es probable que ocurra la recombinación, y bloques de DNA entre estos "puntos calientes" que tienen una baja frecuencia de recombinación. Como resultado, ciertos bloques de DNA (por lo común, de aproximadamente 20 kilobases de longitud) tienden a permanecer intactos a medida que se transmiten de generación en generación. Estos bloques se llaman **haplotipos**. Los haplotipos son como "alelos gigantes multigénicos"; si se selecciona un sitio particular en un cromosoma específico, sólo se puede encontrar, en esa región, un número límite de haplotipos alternativos (**FIGURA 1**). Cada uno de los haplotipos alternativos está definido por un pequeño número de SNP (llamados "etiqueta SNP") en esa región del genoma. Una vez que se determina la identidad de un puñado de etiquetas SNP dentro de un haplotipo, se conoce la identidad del haplotipo completo.

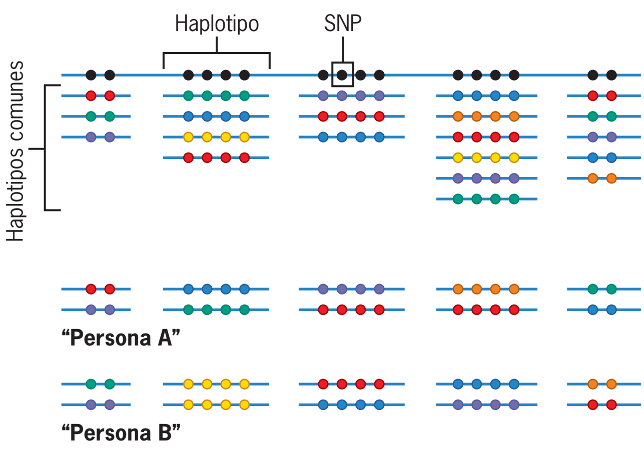



**FIGURA 1 El genoma se divide en bloques (haplotipos).** La línea de la parte superior muestra un segmento hipotético de DNA que contiene una serie de SNP (cada SNP se indica con un círculo relleno). Este segmento en particular consta de cinco haplotipos separados por tramos cortos de DNA que son altamente variables. Cada haplotipo se presenta como un pequeño número de variantes. De cada haplotipo que aquí se muestra, existen entre tres y seis variantes diferentes. Cada variante de haplotipo se caracteriza por un conjunto específico de SNP, indicado por los círculos de colores. Todos los SNP de una variante de haplotipo particular se dibujan con el mismo color, para indicar que se heredan como grupo, y se encuentran juntos en diferentes miembros de la población. Cada persona que se representa en la parte inferior de la ilustración tiene una combinación particular de haplotipos en cada uno de sus dos cromosomas. Algunas variantes de haplotipos se encuentran en muchos grupos étnicos diferentes; otras tienen una distribución más restringida.

En 2002, alrededor de 25 grupos de investigadores comenzaron una colaboración, llamada Proyecto Internacional HapMap, destinada a la identificación y mapeo de los diversos haplotipos que existen dentro de la población humana. El HapMap contendría todos los haplotipos comunes (es decir, haplotipos presentes en, al menos, 5% de la población) que estuvieran presentes a lo largo de la longitud de cada uno de los 24 diferentes cromosomas humanos en 270 miembros de cuatro poblaciones de distintas etnias. El proyecto se completó en 2006 y derivó en la publicación de un HapMap construido por más de cuatro millones de etiquetas SNP espaciadas uniformemente en todo el genoma. Un número de estudios han utilizado HapMap para identificar asociaciones entre una enfermedad particular y un haplotipo específico. El análisis de HapMaps también ha proporcionado datos sobre los orígenes y las migraciones de poblaciones humanas, y ha arrojado información valiosa sobre los factores que han dado forma al genoma humano. Esto se ilustra con el siguiente ejemplo. Si se puede tomar leche luego de ser adultos sin tener molestias en el estómago (es decir, si se es tolerante a la lactosa) depende de qué alelos del gen de lactasa se lleva en el genoma. La tolerancia a la lactosa está asociada con un inusual haplotipo largo que contiene una variación dentro de un sitio regulador que causa que el gen de lactasa se exprese de modo persistente en la edad adulta. Este haplotipo particular está presente, en una alta frecuencia, en poblaciones europeas, que han tenido una larga historia de criar animales lecheros, y es raro en la mayoría de África subsahariana y poblaciones del sudeste asiático, donde no se criaron tales animales. Su alta frecuencia entre los europeos sugiere que este haplotipo particular estaba bajo fuerte presión selectiva positiva en poblaciones que dependieron de los productos lácteos para la nutrición. Este solo haplotipo tiene más de un millón de bases de longitud, lo que indica que no ha estado junto como un bloque el tiempo suficiente para cruzarse y tener la oportunidad de dividirse en segmentos más pequeños. De hecho, se estima que este haplotipo fue sometido a fuerte presión entre 5 000 y 10 000 años atrás, aproximadamente el tiempo en que se cree que apareció la producción lechera. Es interesante notar que varias poblaciones de África oriental, que se dedican a la producción lechera, también exhiben una expresión persistente de lactasa. Las mutaciones responsables para el fenotipo tolerante a la lactosa en estos africanos son diferentes de la mutación encontrada en los europeos, lo que indica que el rasgo evolucionó de forma independiente en los dos grupos y representa un buen ejemplo de evolución convergente dentro del linaje humano.

Una vez celebrado el éxito del HapMap en 2006, algunos genetistas reconocieron que el HapMap era un medio provisional, hasta el momento en que la secuenciación del genoma completo de alto rendimiento fuera más factible. El Proyecto del Genoma Humano, que involucró los esfuerzos de más de mil investigadores que trabajaron durante varios años y condujo a la primera secuencia del genoma humano, se estima que costó cerca de mil millones de dólares. Para 2014, el precio de

secuenciar un genoma humano completo era de alrededor de $ 1 000. Esta importante reducción en costo y esfuerzo ha sido posible gracias al desarrollo de una nueva generación de métodos, para determinar secuencias de DNA (véase Video **Tutorial Experimental: secuenciación del genoma** para este capítulo). Con el uso de nuevas tecnologías, ahora está en marcha la voluntad de secuenciación a gran escala. Una colaboración internacional, llamada Proyecto Genoma 1 000, comenzó en 2008 para comparar las secuencias del genoma de, por lo menos, mil individuos. Para el 2014, el equipo había secuenciado y publicado las secuencias del genoma completo de 1 092 individuos de 14 poblaciones. Los investigadores han comenzado a extraer estos datos genómicos, para identificar variantes en el genoma que puedan favorecer la enfermedad humana. Un nuevo esfuerzo de secuenciación a gran escala, llamado Proyecto de Secuenciación Genómica y de Detección de Trastornos en el Recién Nacido, se lanzó en 2013. Este proyecto busca completar los genomas de 1 500 recién nacidos, para investigar cómo se puede mejorar la detección de enfermedades en ellos. Es importante destacar que los fondos también se han reservado para estudios que analizan las cuestiones éticas, legales y sociales que rodean a la secuencia genómica, temas que probablemente se debatan de manera acalorada durante años, debido a que la secuenciación del genoma se vuelve más común.

Otro desarrollo importante en los últimos años es la capacidad de secuenciar un genoma con cantidades cada vez más pequeñas de la plantilla de inicio de DNA. Estas técnicas permiten a algunos investigadores lograr una hazaña impresionante: secuenciar un genoma completo desde una sola célula. A partir de numerosos estudios, está claro que existe una considerable variabilidad genómica de célula a célula en tejidos sanos y enfermos. La progresión de ciertos cánceres, por ejemplo, se ha atribuido a la acumulación de un número de mutaciones específicas en células tumorales a lo largo del tiempo. Los estudios genómicos de células individuales son muy prometedores, al proporcionar una visión detallada de los cambios genéticos que ocurren en las células tumorales, que eventualmente pueden conducir a innovaciones en el tratamiento y la prevención.

# Preguntas analíticas

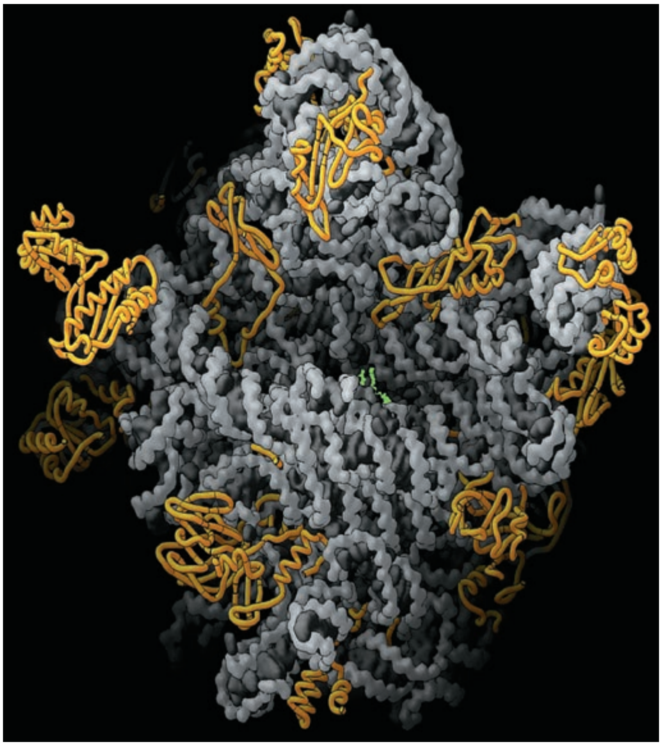
1. ¿Cómo podrían haber diferido los resultados de Mendel, si dos de los siete rasgos que estudió hubieran sido codificados por genes que residían cerca uno del otro en uno de los cromosomas de una planta de guisantes?
2. Sutton proporcionó evidencia visual para la ley de segregación de Mendel. ¿Por qué habría sido imposible para él, visualmente, confirmar o refutar la ley de la distribución independiente de Mendel?
3. Los genes X, Y y Z están ubicados en un cromosoma. Dibuje un mapa simple que muestre el orden de los genes y las distancias relativas entre los genes X, Y y Z usando los datos que aparecen a continuación:

| Frecuencia de cruce | Entre estos genes |
|---|---|
| 36% | X-Z |
| 10% | Y-Z |
| 26% | X-Y |

4. Los alelos en los extremos opuestos de un cromosoma son tan propensos a separarse al entrecruzarse entre ellos que se segregan independientemente. ¿Cómo se podría determinar, usando cruces genéticos, que estos dos genes pertenecen al mismo grupo de ligamiento? ¿Cómo podría establecerse esto usando hibridación con ácido nucleico?
5. ¿En qué parte de la curva de la figura 10-18 esperaría ver la reasociación del DNA que codifica el RNA ribosómico? Suponga que tiene una preparación pura de fragmentos de DNA cuyas secuencias codifican para el RNA ribosomal. Dibuje la reasociación de este DNA superpuesto sobre la curva para obtener el DNA total que se muestra en la figura 10-18.
6. Aproximadamente 5% del genoma humano actual consta de duplicaciones segmentarias que han surgido durante los pasados 35 millones de años. ¿Cómo supone que los investigadores pueden estimar cuánto tiempo ha pasado desde que se duplicó una región particular de un cromosoma?
7. En la página 392 se señaló que, al menos, dos tercios del genoma humano se deriva de elementos transponibles. El número real podría ser mucho más alto, pero es imposible hacer una determinación sobre el origen de muchas otras secuencias ¿Por qué cree que es difícil hacer asignaciones sobre el origen de muchas de las secuencias en el genoma humano?
8. Suponga que tiene dos soluciones de DNA, una de cadena simple y otra de cadena doble, con absorbancia equivalente de luz ultravioleta. ¿Cómo se compararían las concentraciones de DNA en estas dos soluciones?
9. ¿Qué tipo de patrón de etiquetado esperaría después de la hibridación *in situ* entre cromosomas mitóticos y mRNA de mioglobina marcado, y entre los mismos cromosomas y DNA de histona marcado?
10. De acuerdo con la determinación de Chargaff de la composición de base, ¿cuál de las siguientes caracterizaría cualquier muestra de DNA? 1) [A]+[T]=[G]+[C]; 2) [A]/[T]=1; 3)[G]=[C]; 4) [A]+[G]= [T]+[C]. Si el contenido C de una preparación de DNA de cadena doble es 15%, ¿cuál es el contenido A? (Véase **Video Tutorial Cuantitativo**).
11. Si 30% de las bases en un DNA de cadena simple es T, entonces 30% de las bases en esa cadena es A. ¿Verdadero o falso? ¿Por qué?
12. ¿Estaría de acuerdo con la afirmación de que la $T_m$ representa la temperatura a la que 50% de las moléculas de DNA en una solución son de cadena simple?
13. Suponga que hay que encontrar un primate que tenga un gen de globina β con una sola secuencia intermedia. ¿Cree que este animal puede haber evolucionado a partir de un antepasado primitivo que se separó de otros animales antes de la aparición del segundo intrón?
14. En 1996, se publicó un informe en la revista *Lancet* sobre el nivel de expansión de trinucleótidos en el DNA de los donantes de sangre. Estos investigadores encontraron que el nivel de expansión de trinucleótidos disminuyó significativamente con la edad. ¿Puede brindar alguna explicación para estos hallazgos?
15. Suponga que está viendo un SNP particular en el genoma donde la mitad de la población tenía una adenina (A) y la otra mitad tenía una guanina (G). ¿Hay alguna manera en que pueda ser capaz de determinar cuál de estas variantes estaba presente en los seres humanos ancestrales y cómo se volvió frecuente durante la evolución humana?
16. Observe las figuras 10-24 y 10-29. La disposición de los genes que se representan en la primera figura ha evolucionado a lo largo de cientos de millones de años, mientras que en la última figura ha evolucionado durante miles de años. Discuta las posibilidades para la futura evolución de los genes de la amilasa en los seres humanos.

CAPÍTULO 11

# El dogma central: del DNA al RNA a la proteína



Cortesía de Thomas A. Steitz, Universidad de Yale.

El DNA en nuestro genoma contiene toda la información necesaria para construir las proteínas del cuerpo humano, incluidas las necesarias para duplicar el **ácido desoxirribonucleico** (DNA, *deoxyribonucleic acid*), transcribir el DNA en **ácido ribonucleico** (RNA, *ribonucleic acid*) y para traducir luego el RNA a proteínas. La producción de proteínas requiere DNA y RNA, y la replicación del DNA y la producción de RNA requieren proteínas. Esta dependencia mutua crea un problema de huevo y gallina para la evolución. La vida basada en proteínas sería imposible sin DNA o RNA para codificar la secuencia de la proteína. Y la vida basada en DNA o RNA sería imposible sin las enzimas proteicas para copiar el material genético. Entonces, ¿có-

(*continúa*)

Un modelo de la subunidad grande de un ribosoma procariótico determinado por cristalografía de rayos X con una resolución de 2.4 Å. Esta vista examina la hendidura del sitio activo de la subunidad, que consiste totalmente de RNA. El RNA se muestra en gris, la proteína en dorado, y el sitio activo se revela por un inhibidor unido (verde). Se cree que el papel del RNA como catalizador para fabricar proteínas es un vestigio de los orígenes tempranos de la vida en nuestro planeta donde el RNA, más que el DNA o las proteínas, desempeñó el papel principal como genoma y catalizador.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**11.1** Relación entre genes, proteínas y RNA
**11.2** Papel de las RNA polimerasas en la transcripción
**11.3** Descripción general de la transcripción en células procariotas y eucariotas
**11.4** Síntesis y procesamiento de ribosomas eucariotas y los RNA de transferencia
**11.5** Síntesis y estructura de los RNA mensajeros eucarióticos
**11.6** Genes divididos: un hallazgo inesperado
**11.7** Procesamiento de los RNA mensajeros eucarióticos
**11.8** Implicaciones evolutivas de los genes divididos y empalmes de RNA
**11.9** Creación de nuevas ribozimas en el laboratorio
**11.10** Interferencia por RNA
**11.11** **PERSPECTIVA HUMANA:** Aplicaciones clínicas de la interferencia del RNA
**11.12** RNA pequeños: miRNA y piRNA
**11.13** CRISPR y otros RNA no codificantes
**11.14** Codificación de información genética
**11.15** Decodificación de codones: el papel de los RNA de transferencia
**11.16** Traducción de información genética: inicio
**11.17** Traducción de información genética: elongación y terminación
**11.18** Vigilancia mRNA y control de calidad
**11.19** Polirribosomas
**11.20** **VÍAS EXPERIMENTALES:** El papel del RNA como catalizador

mo podría haber comenzado la vida en primer lugar? Como veremos en este capítulo, el RNA puede funcionar como una enzima en algunos casos, y de hecho la catálisis enzimática basada en RNA es parte esencial de la maquinaria para sintetizar proteínas. Aunque en los organismos modernos las enzimas proteicas impulsan la duplicación del DNA, la capacidad de este y del RNA para emparejar bases con nucleótidos libres sugiere un escenario en el cual se formó espontáneamente una secuencia de RNA, que luego pudo autorreplicarse, dando lugar en última instancia a propagar copias de sí misma. Esto se conoce como la hipótesis del "**mundo de RNA**", que propone que la vida comenzó como RNA. Continúa siendo desconocido el aspecto que tendrían exactamente las moléculas de RNA primordiales autopropagables, pero al menos este escenario particular de origen de la vida es comprobable por vía experimental, porque podemos sintetizar moléculas de RNA en el laboratorio y evaluar su habilidad para autorreplicarse y realizar otras funciones bioquímicas básicas. Es probable que la vida más temprana haya sido una combinación de RNA autorreplicante y una membrana simple de algún tipo, que podía intercambiar selectivamente sustancias químicas con el caldo primordial circundante. A lo largo de este capítulo, veremos que el RNA tiene un papel central en la biología molecular, quizás al sevir como recordatorio de sus orígenes antiguos.

## 11.1 Relación entre genes, proteínas y RNA

Nuestro concepto cambiante del gen refleja, en muchos sentidos, el progreso en la biología durante el siglo pasado. Como resultado del trabajo de Mendel, los biólogos aprendieron que los genes son elementos discretos que rigen la aparición de rasgos específicos. De haber tenido la oportunidad, Mendel habría defendido el concepto de que un gen determina un rasgo. Boveri, Weismann, Sutton y sus contemporáneos descubrieron que los genes tienen una expresión concreta como partes del cromosoma. Morgan, Sturtevant y sus colegas demostraron que los genes tienen direcciones específicas: residen en ubicaciones particulares de cromosomas particulares, y estas direcciones permanecen constantes de un individuo de una especie al siguiente. Griffith, Avery, Hershey y Chase demostraron que los genes estaban compuestos de DNA, y Watson y Crick resolvieron el rompecabezas de la estructura del DNA, que explicaba cómo esta notable macromolécula podría codificar información hereditaria.

Aunque las formulaciones de estos conceptos fueron hitos en el camino hacia la comprensión genética, ninguno de ellos abordó el mecanismo por el cual entra en funcionamiento la información almacenada en un gen para gobernar las actividades celulares. Este es el tema principal que se discutirá en el presente capítulo. Comenzaremos con conocimientos adicionales sobre la naturaleza de un gen, lo que nos acerca a su papel en la expresión de rasgos heredados.

### Evidencia de que el DNA es el material genético

La primera percepción significativa de la función genética se debe a Archibald Garrod, un médico escocés que reportó en 1908 que la ausencia de enzimas específicas era la causa de los síntomas que presentaban las personas con ciertas raras enfermedades hereditarias. Una de las enfermedades investigadas por Garrod fue la *alcaptonuria*, una condición que se diagnostica claramente porque la orina se oscurece al exponerse al aire. Garrod descubrió que las personas con alcaptonuria carecían de una enzima en su sangre que oxidaba el ácido homogentísico, un compuesto formado durante la descomposición de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. A medida que se acumula el ácido homogentísico, se excreta en la orina y su color se oscurece cuando se oxida por el aire. Garrod había descubierto la relación entre un defecto genético, una enzima específica, y una condición metabólica específica. Llamó a tales enfermedades "errores congénitos del metabolismo". Como parece haber sucedido con otras observaciones tempranas de importancia básica en genética, los hallazgos de Garrod no fueron apreciados durante décadas.

La idea de que los genes dirigen la producción de enzimas fue resucitada en la década de 1940 por George Beadle y Edward Tatum del Instituto de Tecnología de California. Estudiaron *Neurospora*, un hongo del pan tropical que crece en un medio muy simple, que contiene una única fuente de carbono orgánico (p. ej., un azúcar), sales inorgánicas y biotina (una vitamina B). Debido a que necesita tan poco para vivir, se supuso que *Neurospora* sintetizaba todos sus metabolitos requeridos. Beadle y Tatum razonaron que un organismo con una capacidad sintética tan amplia debería ser muy sensible a las deficiencias enzimáticas, lo que se podría detectar con facilidad utilizando el protocolo experimental adecuado. Un esquema simplificado de su protocolo se da en la **FIGURA 11-1**.

El plan de Beadle y Tatum era irradiar esporas de moho y analizarlas en busca de mutaciones que causaran que las células carecieran de una enzima particular. Se usó radiación para dañar el DNA y crear cambios en su secuencia (mutaciones). Para detectar estas mutaciones que afectan a las enzimas, se analizaron las esporas irradiadas para determinar su capacidad de crecimiento en un *medio mínimo*, que carecía de los compuestos esenciales conocidos por ser sintetizados por ese organismo (véase figura 11-1). Si una espora no puede crecer en un medio mínimo, pero una espora genéticamente idéntica puede crecer en un medio suplementado con un compuesto metabólico particular (p. ej., ácido pantoténico), entonces los investigadores podrían concluir que las células tienen una deficiencia enzimática que les impide sintetizar este compuesto esencial.

Beadle y Tatum comenzaron irradiando más de mil células. Dos de las esporas demostraron ser incapaces de crecer en el medio mínimo: una necesitaba piridoxina (vitamina $B_6$) y la otra requería tiamina (vitamina $B_1$). Eventualmente, se probó una progenie de aproximadamente 100 000 esporas irradiadas, y se aislaron docenas de mutantes. Cada mutante tenía un defecto genético, que producía una deficiencia enzimática que impedía que las células catalizaran una reacción metabólica particular. Los resultados fueron claros: un gen lleva la información para la construcción de una enzima particular. Esta conclusión se conoció como la hipótesis "un gen, una enzima". Una vez que se supo que las enzimas a menudo están compuestas de más de un polipéptido, cada uno de los cuales está codificado por su propio gen, el concepto se modificó a "un gen, un polipéptido". Aunque esta relación sigue siendo una aproximación cercana de la función básica de un gen, también ha tenido que ser modificada debido al descubrimiento de que un único gen a menudo genera una variedad de polipéptidos, principalmente como resultado del corte y empalme alternativo (discutido en la sección 12.18). También sería evidente que la descripción de un gen de manera estricta como un almacén de información para polipéptidos es una definición demasiado estrecha. Muchos genes codifican moléculas de RNA, que en lugar de contener información para la síntesis de polipép-

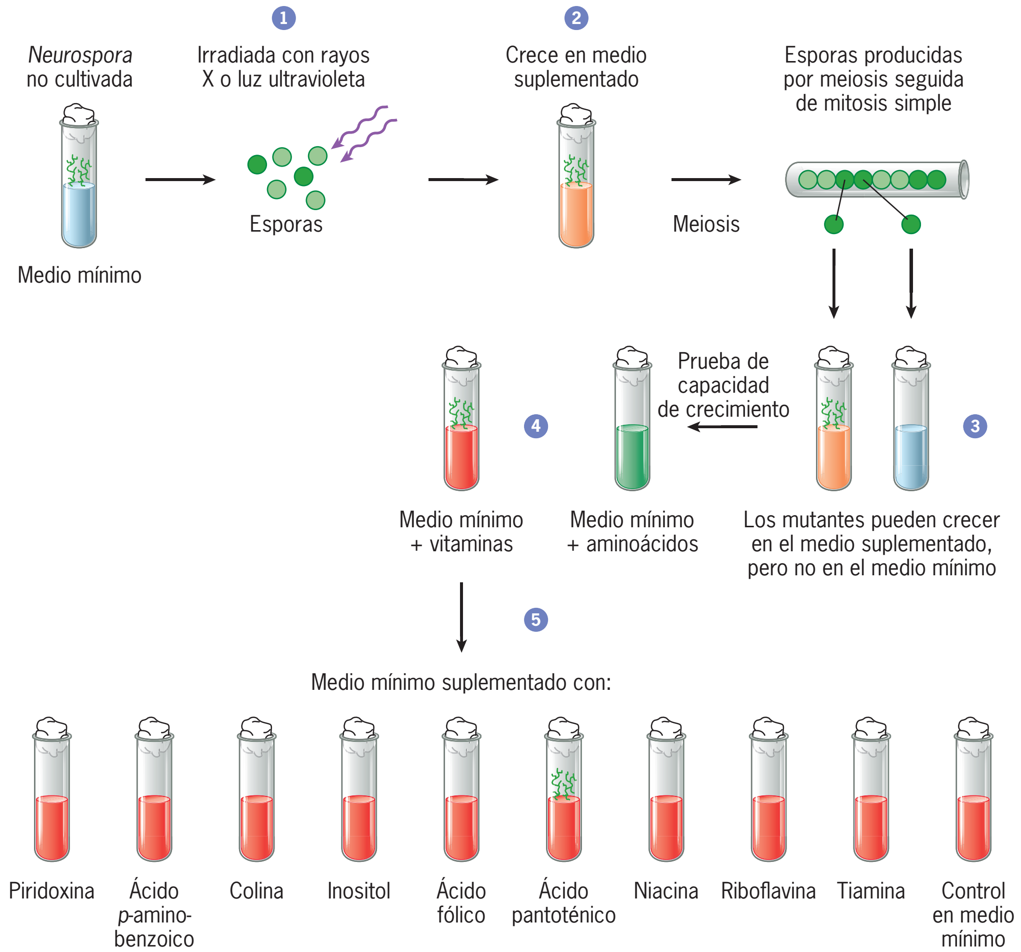



**FIGURA 11-1 Experimento Beadle-Tatum para el aislamiento de mutantes genéticos en *Neurospora*.** Se irradiaron las esporas para inducir mutaciones (paso 1) y se dejaron crecer en colonias en tubos que contenían un medio suplementado (paso 2). Luego se analizaron las esporas genéticamente idénticas producidas por las colonias para determinar su capacidad de crecer en medio suplementado o mínimo (paso 3). Aquellas que no lograron crecer en un medio mínimo eran mutantes; la tarea era identificar el gen mutante. En el ejemplo que se muestra en el paso 4, se encontró que una muestra de células mutantes crecía en el medio mínimo suplementado con vitaminas, pero no crecía en el medio suplementado con aminoácidos. Esta observación indica una deficiencia en una enzima que conduce a la formación de una vitamina. En el paso 5, el crecimiento de estas mismas células en medio mínimo suplementado con una u otra de las vitaminas indica que la deficiencia reside en un gen implicado en la formación del ácido pantoténico (parte de la coenzima A).

tidos funcionan como RNA en sí mismas. Con esto en mente, podría ser mejor definir un gen como un segmento de DNA que contiene la información para una sola cadena polipeptídica o para uno o más RNA funcionales.

## Visión general del flujo de información a través de la célula

Los genes contienen la información necesaria para fabricar polipéptidos, pero esta información se almacena en una forma inerte, como una tira de bases de DNA que no puede realizar ninguna función metabólica en la célula. La **expresión génica** se refiere a la producción de un producto funcional (p. ej., una enzima) usando la información codificada en un gen. La información presente en un segmento de DNA se pone a disposición de la célula mediante la formación de una molécula de RNA. La síntesis de un RNA a partir de una plantilla de DNA se denomina **transcripción**. El término *transcripción* denota un proceso en el que la información codificada en las cuatro letras desoxirribonucleótidas del DNA se reescribe, o se transcribe, en un lenguaje similar compuesto por cuatro letras ribonucleótidas de RNA. Examinaremos el mecanismo de la transcripción en breve, pero primero continuaremos con la función de un gen en la formación de polipéptidos.

Los estudios llevados a cabo en la década de 1950 descubrieron la relación entre la información genética y la secuencia de aminoácidos, pero este conocimiento en sí mismo no proporcionaba ninguna pista sobre el mecanismo por el cual se genera una cadena polipeptídica específica. Como ahora sabemos, hay un intermediario entre un gen y su polipéptido; el intermediario es el **RNA mensajero (mRNA)**. El descubrimiento trascendental del mRNA fue realizado en 1961 por François Jacob y Jacques Monod del Instituto Pasteur de París, Sydney Brenner de la Universidad de Cambridge, y Matthew Meselson del Instituto de Tecnología de California. Un RNA mensajero se ensambla como una copia complementaria de una de las dos cadenas de DNA que componen un gen. Debido a que su secuencia de nucleótidos es complementaria a la del gen del cual se transcribe, el mRNA conserva la misma información para el ensamblaje de polipéptidos que el gen mismo. Por esta razón, un mRNA también se puede describir como una cadena "de sentido" o un RNA de codificación. Los mRNA eucariotas no se sintetizan en su forma final (o madura), sino que se deben extraer (o procesar) a partir de mayores pre-mRNA. En la **FIGURA 11-2** se ilustra una visión general del papel del mRNA en el flujo de información a través de una célula eucariota.

El uso de RNA mensajero permite a la célula separar el almacenamiento de información del uso de esta. Mientras que el gen permanece almacenado en el núcleo como parte de una enorme

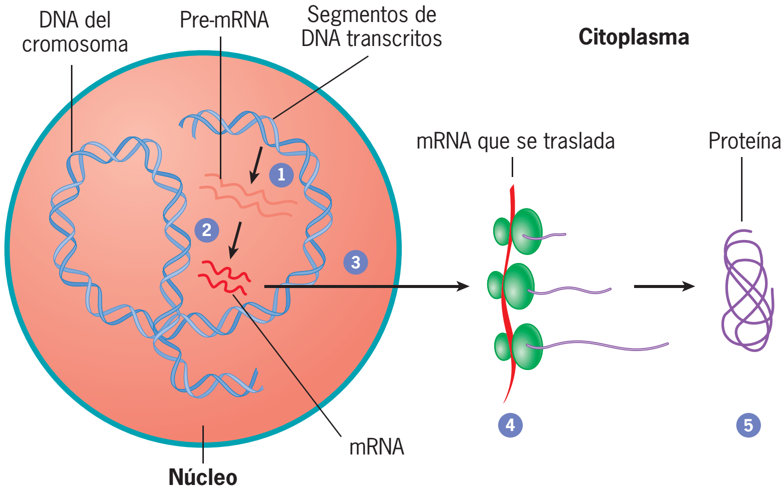



**FIGURA 11-2 Visión general del flujo de información en una célula eucariota.** El DNA de los cromosomas ubicados dentro del núcleo contiene todo el almacén de información genética. Los sitios seleccionados en el DNA se transcriben en los pre-mRNA (paso 1), que se procesan en RNA mensajeros (paso 2). Los RNA mensajeros se transportan fuera del núcleo (paso 3) hacia el citoplasma, donde se transcriben en polipéptidos mediante ribosomas que se mueven a lo largo del mRNA (paso 4). Después de la traducción, el polipéptido se pliega para asumir su conformación original (paso 5).

molécula de DNA estacionaria, su información se puede transmitir a un ácido nucleico móvil mucho más pequeño que pasa al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el mRNA puede servir como plantilla para dirigir la incorporación de aminoácidos en un orden particular codificado por la secuencia de nucleótidos del DNA y mRNA. El uso de un RNA mensajero también permite que una célula amplifique en gran medida su salida de síntesis. Una molécula de DNA puede servir como plantilla en la formación de muchas moléculas de mRNA, cada una de las cuales se puede usar en la formación de un gran número de cadenas de polipéptidos. El concepto de un gen con base en DNA que codifica un mensaje basado en RNA, que luego se traduce en una proteína, se conoce como el **dogma central**.

Las proteínas se sintetizan en el citoplasma mediante un complejo proceso llamado **traducción genética**. La traducción requiere la participación de docenas de diferentes componentes, incluidos los ribosomas. Los ribosomas son "máquinas" complejas y citoplásmicas, que se pueden programar como un ordenador para traducir la información codificada por cualquier mRNA. Los ribosomas contienen tanto proteínas como RNA. Los RNA de un ribosoma se llaman **RNA ribosómicos (rRNA, *ribosomal* RNA)**, y al igual que los mRNA, cada uno se transcribe a partir de una de las cadenas de DNA de un gen. En lugar de funcionar en una capacidad informativa, los rRNA proporcionan un soporte estructural para construir el ribosoma, y ayudar a catalizar la reacción química en la que los aminoácidos se unen en forma covalente entre sí. Los **RNA de transferencia (o tRNA, *transfer* RNA)** constituyen una tercera clase importante de RNA que se requiere durante la síntesis de proteínas. Se requieren RNA de transferencia para traducir la información en código de los nucleótidos del mRNA al "alfabeto" de aminoácidos de un polipéptido.

Tanto los rRNA como los tRNA deben su actividad a sus complejas estructuras secundarias y terciarias. A diferencia del DNA, que tiene una estructura helicoidal similar de doble cadena que no depende de la fuente, muchos RNA se pliegan en una forma tridimensional compleja, que es marcadamente diferente entre un tipo de RNA y otro. Así, al igual que las proteínas, los RNA llevan a cabo una amplia gama de funciones debido a sus diferentes formas. Como ocurre con las proteínas, el plegamiento de las moléculas de RNA sigue ciertas reglas. Mientras que la extracción de residuos hidrófobos en su interior impulsa el plegamiento de las proteínas, el plegamiento del RNA es impulsado por la formación de regiones que tienen pares de bases complementarias (consúltese **FIGURA 11-3**). Como se ve en la figura 11-3, es típico que las regiones emparejadas por bases formen "pedúnculos" bicatenarios (y de doble hélice), que están conectados a "bucles" de cadena simple. A diferencia del DNA, que consiste exclusivamente en pares de bases estándar Watson-Crick (G-C, A-T), los RNA a menudo contienen pares de bases no estándar (recuadro, véase figura 11-3) y bases modificadas de nitrógeno. Estas regiones no ortodoxas de la molécula sirven como sitios de reconocimiento para proteínas y otros RNA, promueven el plegamiento del RNA, y ayudan a estabilizar la estructura de la molécula. La importancia del apareamiento complementario de bases se extiende mucho más allá de la estructura del tRNA y rRNA. Como veremos a lo largo de este capítulo, el emparejamiento de bases *entre* moléculas de RNA desempeña un papel central en la mayoría de las actividades en las que están comprometidos los RNA.

El papel de los mRNA, rRNA y tRNA se explora en detalle en las siguientes secciones de este capítulo. Las células eucariotas forman una serie de otros RNA, que también desempeñan papeles vitales en el metabolismo celular; estos incluyen RNA pequeños nucleares (snRNA, *small nuclear RNA*), RNA pequeños nucleolares (snoRNA, *small nucleolar RNA*), RNA pequeños de interferencia (siRNA, *small interfering RNA*), piRNA, microRNA (miRNA, *microRNA*) y una variedad de otros RNA no codificantes, es decir, RNA que no contienen información para secuencias de aminoácidos. La mayoría de estos RNA cumplen una función reguladora, controlando varios aspectos de la expresión génica. Varios de estos RNA han irrumpido en la escena en los últimos

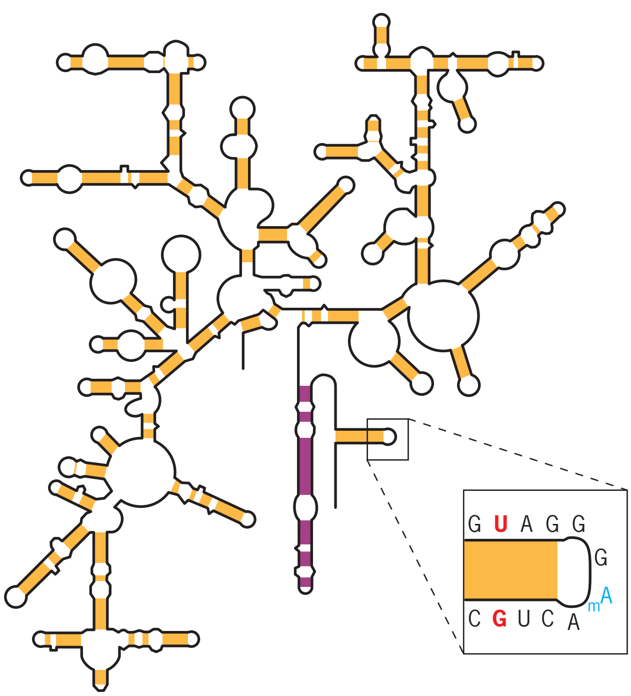



**FIGURA 11-3 Estructura bidimensional de un RNA ribosómico bacteriano que muestra el apareamiento de bases extensivo entre las diferentes regiones de la hebra simple.** La sección expandida muestra la secuencia de bases de un pedúnculo y un lazo, que incluye un par de bases no estándar (G-U) y un nucleótido modificado, metiladenosina. Una de las hélices está sombreada de forma diferente porque desempeña un papel importante en la función de los ribosomas, como se explica en la página 445. En la figura 11-41*b*) se muestra un ejemplo de la estructura tridimensional de un RNA.

 años, recordándonos una vez más que hay muchas actividades celulares ocultas, a la espera de ser descubiertas.

Para obtener material de referencia sobre la estructura del RNA se puede revisar la sección 2.18.



**REPASO**

1. ¿Cómo pudieron Beadle y Tatum llegar a la conclusión de que un gen codificaba una enzima específica?
2. Distinga entre las estructuras bidimensional y tridimensional de los RNA.

## 11.2 Papel de las RNA polimerasas en la transcripción

La transcripción es un proceso en el que una hebra de DNA proporciona la información para la síntesis de una hebra de RNA. Las enzimas responsables de la transcripción en células procariotas y eucariotas se denominan **RNA polimerasa dependiente de DNA**, o simplemente **RNA polimerasas**. Estas enzimas son capaces de incorporar nucleótidos, uno a la vez, en una hebra de RNA cuya secuencia es complementaria a una de las hebras del DNA que sirve como *plantilla*.

El primer paso en la síntesis de un RNA es la asociación de la polimerasa con la plantilla del DNA. Esto trae a colación una cuestión de interés más general, a saber, las interacciones específicas de dos macromoléculas, proteínas y ácidos nucleicos muy diferentes. Del mismo modo que diferentes proteínas han evolucionado para unir diferentes tipos de sustratos y catalizar diferentes tipos de reacciones, también algunas de ellas han evolucionado para reconocer y unirse a secuencias específicas de nucleótidos en una hebra de ácido nucleico. El sitio del DNA al que se une una molécula de RNA polimerasa antes de iniciar la transcripción se denomina **promotor**. Las RNA polimerasas celulares no son capaces de reconocer a los promotores por sí mismas, sino que requieren la ayuda de proteínas adicionales llamadas **factores de transcripción**. Además de proporcionar un sitio de unión para la polimerasa, el promotor contiene la información que determina cuál de las dos hebras de DNA se transcribe, y el sitio donde comienza la transcripción.

La RNA polimerasa se mueve a lo largo de la hebra plantilla de DNA hacia su extremo 5′ (es decir, en una dirección 3′→5′). A medida que la polimerasa progresa, el DNA se desenrolla temporalmente y la polimerasa ensambla una hebra complementaria de RNA que crece con inicio en su extremo 5′ en una dirección 3′ (véase **FIGURA 11-4 *a*,*b***). La RNA polimerasa cataliza la reacción altamente favorable

$$RNA_n + NTP \rightarrow RNA_{n+1} + PP_i$$

donde los sustratos ribonucleósidos trifosfato (NTPs, *ribonucleoside triphosphate substrates*) se escinden en nucleósidos monofosfatos, a medida que se polimerizan en una hebra covalente (consúltese figura 11-4*c*). Las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos nucleicos (y proteínas) son intrínsecamente diferentes de las del metabolismo intermediario discutido en el capítulo 3. Mientras que algunas de las reacciones que conducen a la formación de moléculas pequeñas, como los aminoácidos, pueden estar lo suficientemente cerca del equilibrio como para poder medir una reacción inversa considerable, las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas deben ocurrir bajo condiciones en que virtualmente no hay reacción inversa. Esta condición se cumple durante la transcripción con la ayuda de una segunda reacción favorable

$$PP_i \rightarrow 2P_i$$

catalizada por una enzima diferente, una pirofosfatasa. En este caso el pirofosfato ($PP_i$, *pyrophosphate*) producido en la primera reacción se hidroliza a fosfato inorgánico (Pi, *inorganic phosphate*). La hidrólisis del pirofosfato libera una gran cantidad de energía libre, y hace que la reacción de incorporación de nucleótidos sea esencialmente irreversible.

A medida que la polimerasa se mueve a lo largo de la plantilla de DNA, incorpora nucleótidos complementarios en la cadena creciente de RNA. Un nucleótido se incorpora en la hebra de RNA si es capaz de formar un par de bases apropiadas (Watson-Crick) con el nucleótido en la hebra de DNA que se está transcribiendo. Esto se puede ver en la figura 11-4*c*) donde la adenosina 5′-trifosfato entrante se empareja con el nucleótido que contiene timina de la plantilla. Una vez que la polimerasa ha pasado un determinado tramo de DNA, la doble hélice del DNA se reforma (como en la figura 11-4a, *b*). En consecuencia, la hebra de RNA no permanece asociada con su plantilla como un híbrido DNA-RNA (excepto por aproximadamente nueve nucleótidos justo detrás del sitio donde la polimerasa está operando). Las RNA polimerasas son capaces de incorporar de 20 a 50 nucleótidos por segundo aproximadamente en una molécula de RNA en crecimiento, y muchos genes en una célula se transcriben simultáneamente por cien o más polimerasas. La frecuencia con la que se transcribe un gen está regulada estrechamente, y puede variar drásticamente en dependencia del gen dado y las condiciones que prevalecen. La micrografía electrónica de la figura 11-4*d*) muestra una molécula de DNA de fago con varias moléculas de RNA polimerasa enlazadas.

Las RNA polimerasas son capaces de formar RNA prodigiosamente largos. En consecuencia, la enzima debe permanecer unida al DNA durante largos tramos de plantilla (se dice entonces que la enzima es *progresiva*). Al mismo tiempo, la enzima debe estar asociada de forma bastante libre como para moverse de un nucleótido a otro de la plantilla. Es difícil estudiar ciertas propiedades de las RNA polimerasas, tal como la progresividad, mediante el uso de metodologías bioquímicas que tienden a promediar las diferencias entre las moléculas de las proteínas individuales. En consecuencia, para seguir las actividades de las moléculas de RNA polimerasa individuales, los investigadores han desarrollado técnicas similares a las utilizadas para estudiar los motores citoesqueléticos individuales. Dos ejemplos de tales estudios son representados en la **FIGURA 11-5**. En ambos ejemplos una sola RNA polimerasa se une a la superficie de un portaobjetos de vidrio, y se le permite transcribir una molécula de DNA que contiene una perla fluorescente unida en forma covalente a uno de sus extremos. El movimiento de la esfera fluorescente se puede monitorear bajo un microscopio de fluorescencia.

En la figura 11-5*a*) la perla es libre de moverse en el medio, y su intervalo de movimiento es proporcional a la longitud del DNA entre la polimerasa y la perla. A medida que la polimerasa transcribe la plantilla la hebra del DNA de conexión se alarga, y se incrementa el movimiento de la esfera. Este tipo de sistema permite a los investigadores estudiar la velocidad de transcripción de una polimerasa individual, y determinar si la polimerasa transcribe el DNA en un movimiento constante o discontinuo. En la figura 11-5*b*) la perla al final de la molécula de DNA que se transcribe queda atrapada por un rayo láser enfocado (página 319). La fuerza mínima ejercida por la trampa láser se puede variar, hasta que sea suficiente para evitar que la polimerasa continúe transcribiendo el DNA. Las mediciones realizadas en moléculas individuales de RNA polimerasa en el acto de la transcripción indican que estas enzimas se pueden mover sobre la plantilla, una base a la vez (3.4 Å), con una fuerza varias veces mayor que la de una molécula de miosina (véase capítulo 9 para la discusión de la miosina y otras proteínas motoras).

A pesar de que las polimerasas son motores relativamente potentes estas enzimas no necesariamente se mueven de manera constante, sino que pueden hacer pausa en ciertos lugares a lo largo de la plantilla, o incluso retroceder antes de reanudar su avance. Se han identificado varios factores de elongación que me-

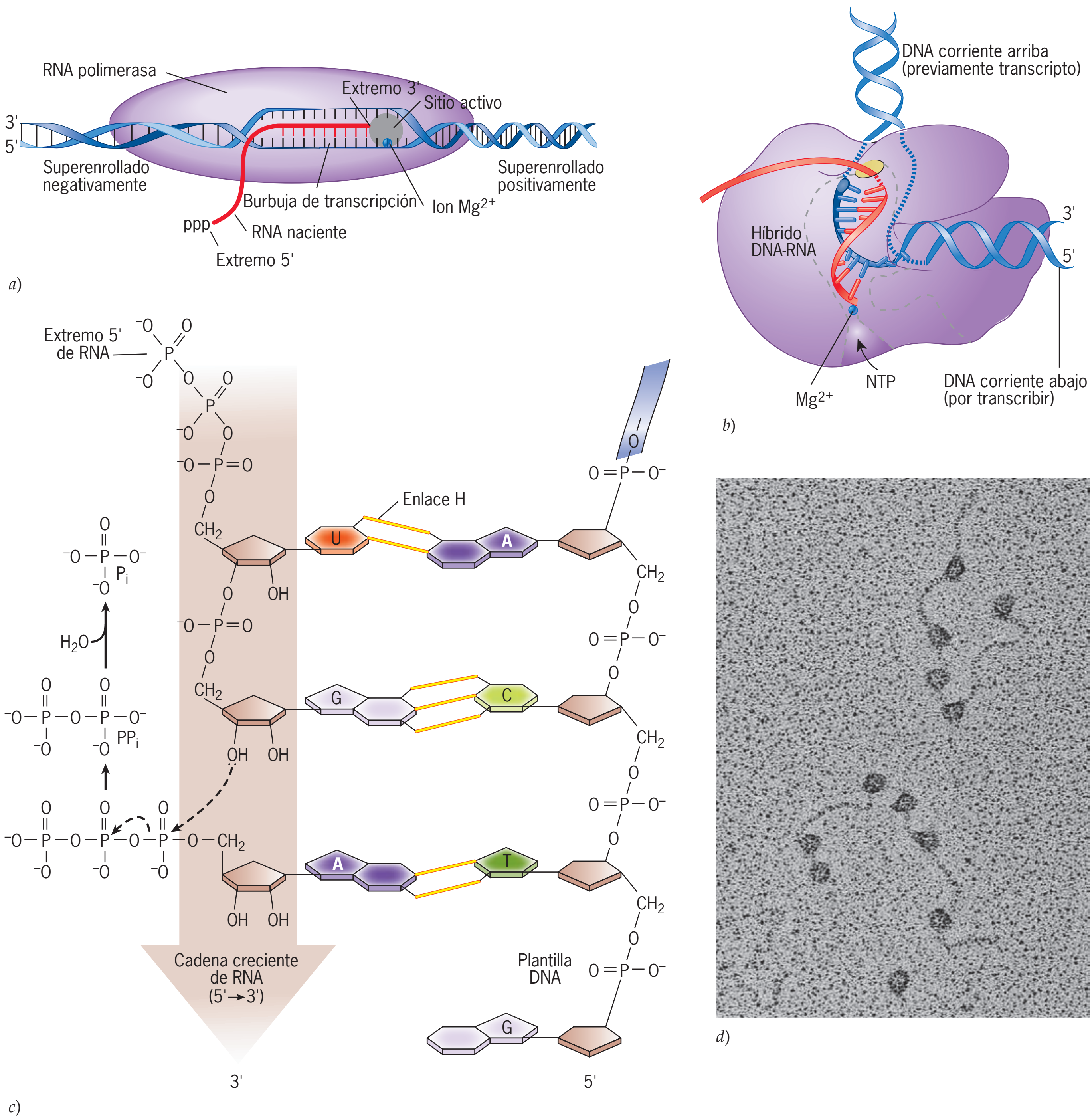



**FIGURA 11-4 Elongación de hebra durante la transcripción.** *a*) Un modelo esquemático de la elongación de una molécula recién sintetizada de RNA durante la transcripción. La polimerasa cubre aproximadamente 35 pares de bases de DNA, la burbuja de transcripción compuesta de DNA de hebra simple (disuelto) contiene aproximadamente 15 pares de bases, y el segmento presente en un híbrido DNA-RNA incluye aproximadamente nueve pares de bases. La enzima genera DNA sobreserpenteado (superenrollado positivamente) delante de sí misma y DNA subserpenteado (superenrollado negativamente) tras de sí misma (página 381). Estas condiciones se relevan mediante topoisomerasas (página 381). *b*) Dibujo esquemático de una RNA polimerasa en el acto de elongación de la transcripción. El DNA corriente abajo se encuentra en un surco dentro de la polimerasa, fijado por un par de mandíbulas formadas por las dos subunidades más grandes de la enzima. El DNA realiza un giro brusco en la región del sitio activo, de modo que el DNA corriente arriba se extiende hacia arriba en este dibujo. El RNA naciente sale del sitio activo de la enzima a través de un canal separado. *c*) Resultados de la elongación de la hebra tras un ataque por el 3′OH del nucleótido al final de la hebra de crecimiento en el 5′-fosfato del nucleósido trifosfato entrante. El pirofosfato liberado se escinde posteriormente, lo que impulsa la reacción en la dirección de la polimerización. La geometría del emparejamiento de bases entre el nucleótido de la hebra plantilla y el nucleótido entrante determina cuál de los cuatro posibles nucleósido trifosfatos se incorpora a la hebra de RNA en crecimiento en cada sitio. *d*) Microfotografía electrónica de varias moléculas de RNA polimerasa unidas a una plantilla de DNA fágico.

FUENTE: *d*) Cortesía de Robley C. Williams.

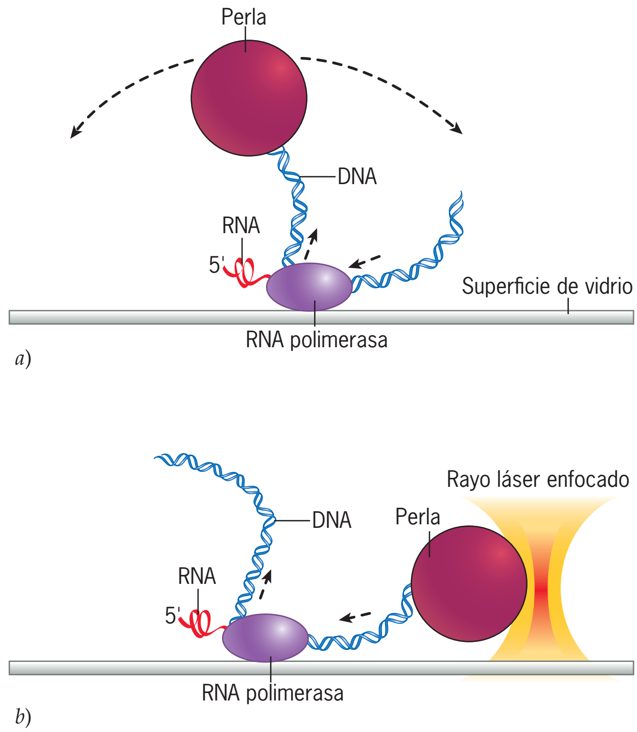



**FIGURA 11-5 Ejemplos de técnicas experimentales para seguir las actividades de moléculas aisladas de RNA polimerasa.** *a*) En este protocolo la molécula de RNA polimerasa se une al portaobjetos subyacente y se le permite transcribir una molécula de DNA que contiene una perla fluorescente en el extremo corriente arriba. Las flechas indican el movimiento del DNA a través de la polimerasa. La velocidad de movimiento y la progresión de la polimerasa se pueden registrar mediante la observación de la posición de la perla a lo largo del tiempo con un microscopio de fluorescencia. *b*) En este protocolo, la polimerasa unida está transcribiendo una molécula de DNA con una perla en su extremo corriente abajo. Como en *a*, las flechas indican la dirección del movimiento del DNA. La perla queda atrapada en una trampa óptica (láser) que proporciona una fuerza conocida, que se puede variar ajustando el rayo láser. Este tipo de aparato puede medir las fuerzas generadas por una polimerasa que se transcribe.

FUENTE: Reimpreso de J. Gelles y R. Landick. *Cell* 1998;93:15, copyright 1998, con permiso de Elsevier Science.

joran la capacidad de la enzima para atravesar estos diversos obstáculos. En algunos casos, como ocurre después de la rara incorporación de un nucleótido incorrecto, una polimerasa detenida debe retroceder y luego asimilar el extremo 3′ del transcripto recién sintetizado, y volver a sintetizar la parte faltante antes de continuar su movimiento. La capacidad de la RNA polimerasa para reconocer y eliminar un nucleótido incorporado erróneamente se conoce como **corrección de pruebas**. Esta función correctora se lleva a cabo en el mismo sitio activo dentro de la enzima que es responsable de la incorporación de nucleótidos.

**REPASO**

1. ¿Cuál es el papel de un promotor en la expresión génica? ¿Dónde se encuentran los promotores de las polimerasas bacterianas?

## 11.3 Descripción general de la transcripción en células procariotas y eucariotas

En este punto es útil examinar las diferencias en el proceso de transcripción entre células bacterianas y eucariotas.

### Transcripción en bacterias

Las bacterias como *E. coli* contienen un único tipo de RNA polimerasa, compuesto por cinco subunidades estrechamente asociadas para formar una *enzima central*. Si la enzima central se purifica a partir de células bacterianas, y se agrega a una disolución de moléculas de DNA bacteriano y ribonucleósidos trifosfato, la enzima se une al DNA y sintetiza el RNA. Sin embargo, las moléculas de RNA producidas por una polimerasa purificada no son las mismas que las que se encuentran dentro de las células, porque la enzima central se ha unido a sitios aleatorios en el DNA (véase **FIGURA 11-6*a***), sitios que normalmente habría ignorado *in vivo*.

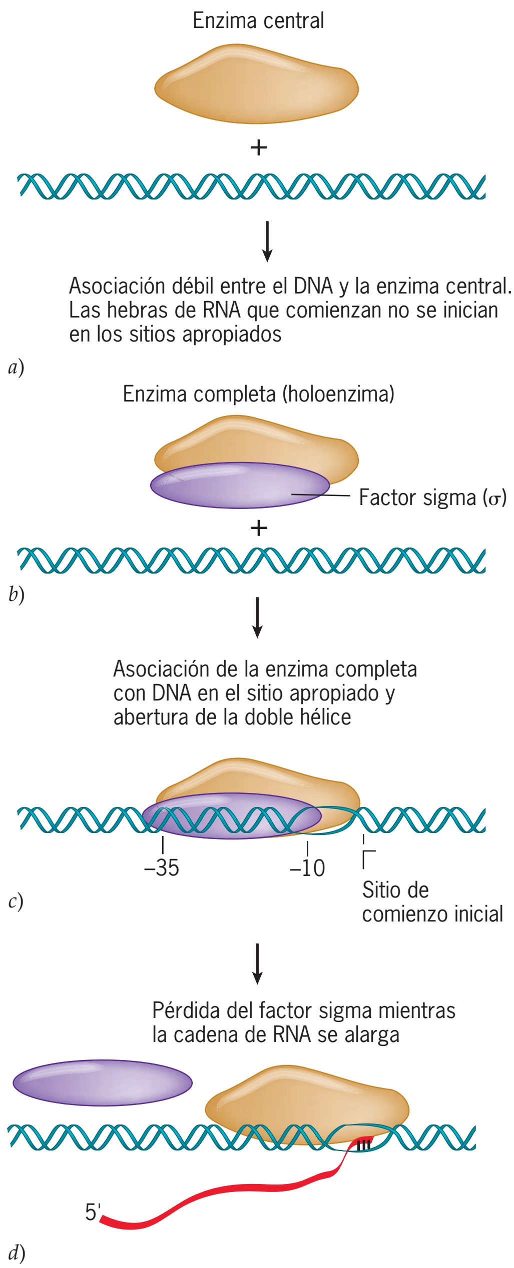



**FIGURA 11-6 Representación esquemática del inicio de la transcripción en bacterias.** *a*) En ausencia del factor σ, la enzima central no interactúa con el DNA en sitios de inicio específicos. *b-d*) Cuando la enzima central se asocia con el factor σ, la enzima completa (u holoenzima) puede reconocer y unirse a las regiones promotoras del DNA, separar las hebras de la doble hélice de DNA, e iniciar la transcripción a los sitios de inicio apropiados (véase figura 11-7). En el modelo tradicional que se muestra aquí, el factor σ se disocia de la enzima central, que es capaz de una elongación de transcripción. Varios estudios sugieren que, al menos en algunos casos, σ puede permanecer con la polimerasa.

Sin embargo, si se agrega un polipéptido accesorio purificado llamado *factor sigma* (σ) a la RNA polimerasa, antes de que se una al DNA, la transcripción comienza en lugares seleccionados (véase figura 11-6*b-d*). La unión del factor σ a la enzima central aumenta la afinidad de la enzima por los sitios promotores en el DNA, y disminuye su afinidad por el DNA en general. Como resultado, se cree que la enzima completa se desliza libremente a lo largo del DNA, hasta que reconoce y se une a una región promotora adecuada.

El análisis cristalográfico por rayos X de la RNA polimerasa bacteriana (véase figura 11-8) revela una molécula en forma de pinza de cangrejo con un par de tenazas móviles (o mandíbulas) que encierra un canal interno con carga positiva. A medida que el factor σ interactúa con el promotor, las mandíbulas de la enzima se adhieren al dúplex de DNA corriente abajo, que reside dentro del canal (como en la figura 11-4b). La enzima luego separa (o *disuelve*) las dos hebras de DNA en la región que rodea el sitio de inicio (obsérvese figura 11-6c). El complejo de la polimerasa, factor σ y DNA con las hebras separadas se denomina *complejo abierto*. La separación de las hebras hace que la hebra de plantilla sea accesible para el sitio activo de la enzima, que reside en la pared posterior del canal. El inicio de la transcripción parece ser una tarea difícil, porque una RNA polimerasa por lo general hace varios intentos fallidos para ensamblar una transcripción de RNA. Una vez que aproximadamente 10 nucleótidos se han incorporado con éxito en una transcripción creciente, la enzima experimenta un cambio importante en la conformación, y se transforma en un *complejo de elongación transcripcional* que se puede mover progresivamente a lo largo del DNA. En el modelo que se muestra en la figura 11-6*d*), la formación de un complejo de elongación es seguida por la liberación del factor σ.

Como se indicó anteriormente, los promotores son los sitios en el DNA que se unen a la RNA polimerasa. Los promotores bacterianos se localizan en la región de una hebra de DNA justo antes del sitio de inicio de la síntesis de RNA (consúltese **FIGURA 11-7**). El nucleótido en el que se inicia la transcripción se denota como +1 y el nucleótido precedente como –1. Se dice que las partes del DNA que preceden al sitio de inicio (hacia el extremo 3′ de la hebra plantilla) están *corriente arriba* de ese sitio. Se dice que las partes del DNA que lo suceden (hacia el extremo 5′ de la hebra plantilla) están *corriente abajo* de ese sitio. El análisis de las secuencias de DNA justo corriente arriba de una gran cantidad de genes bacterianos revela que dos tramos cortos de DNA son similares de un gen a otro. Uno de estos tramos se centra aproximadamente a 35 bases corriente arriba del sitio de inicio, y es típico que se produzca como la secuencia TTGACA (véase figura 11-7). Esta secuencia TTGACA (conocida como el elemento –35) se denomina **secuencia consenso**, lo que indica que es la versión más común de una secuencia conservada, pero que algunas variaciones ocurren de un gen a otro. La segunda secuencia conservada se encuentra aproximadamente 10 bases corriente arriba del sitio de inicio, y se produce en la secuencia consenso TATAAT (consúltese figura 11-7). Este sitio en el promotor, denominado el *elemento –10* según su posición, o *caja Pribnow* en honor a su descubridor, es responsable de identificar el nucleótido preciso en el que comienza la transcripción. Como el factor sigma reconoce la caja Pribnow, los residuos de aminoácidos dentro de la proteína interactúan con cada uno de los seis nucleótidos de la secuencia TATAAT de la hebra no plantillada. Dos de estos nucleótidos son expulsados del montón de nucleótidos hacia el núcleo de la proteína. Esta acción probablemente inicia la fusión de la región adyacente del DNA promotor, y la formación de la burbuja de transcripción observada en las figuras 11-6 y 11-7.

Las células bacterianas poseen una variedad de diferentes factores que reconocen diferentes versiones de la secuencia promotora. El $\sigma^{70}$ se conoce como factor σ de “mantenimiento”, ya que inicia la transcripción de la mayoría de los genes. Factores σ alternativos inician la transcripción de un pequeño número de genes específicos que participan en una respuesta común. Por ejemplo, cuando las células de *E. coli* se someten a un aumento repentino de temperatura, se sintetiza un nuevo factor σ que reconoce una secuencia promotora diferente, y conduce a la transcripción coordinada de una batería de *genes de choque térmico*. Los productos de estos genes protegen las proteínas celulares del daño térmico (véase “Vías experimentales” para el capítulo 2).

Así como la transcripción se inicia en puntos específicos en el cromosoma, también termina cuando se alcanza una secuencia específica de nucleótidos. Aproximadamente en la mitad de los casos se requiere una proteína en forma de anillo llamada *rho* para la terminación de la transcripción bacteriana. La rho rodea el RNA recién sintetizado y se mueve a lo largo de la hebra en una dirección 5′→3′ hacia la polimerasa, donde separa el RNA transcripto del DNA al que está unido. En otros casos la polimerasa detiene la transcripción cuando alcanza una *secuencia de terminación*. Las secuencias de terminación usualmente se pliegan en un lazo de horquilla, que hace que la RNA polimerasa libere la cadena completa de RNA sin necesidad de factores adicionales.

## Transcripción y procesamiento del RNA en células eucariotas

Las células eucariotas tienen tres enzimas de transcripción distintas en sus núcleos celulares. Cada una de estas enzimas es responsable de sintetizar un grupo diferente de RNA (consúltese tabla 11-1). Las plantas tienen dos RNA polimerasas adicionales que no son esenciales para la vida. No se han encontrado procariotas con múltiples RNA polimerasas, mientras que las eucariotas más simples (levadura) tienen los mismos tres tipos nucleares que están presentes en las células de mamíferos. Esta diferencia en el número de RNA polimerasas es otra clara distinción entre células procariotas y eucariotas.

La **FIGURA 11-8*a*)** muestra las estructuras superficiales de las RNA polimerasas de cada uno de los tres dominios de vida: arqueas, bacterias y eucariotas. A partir del examen detallado de esta ilustración se aprecian varias características. Resulta eviden-



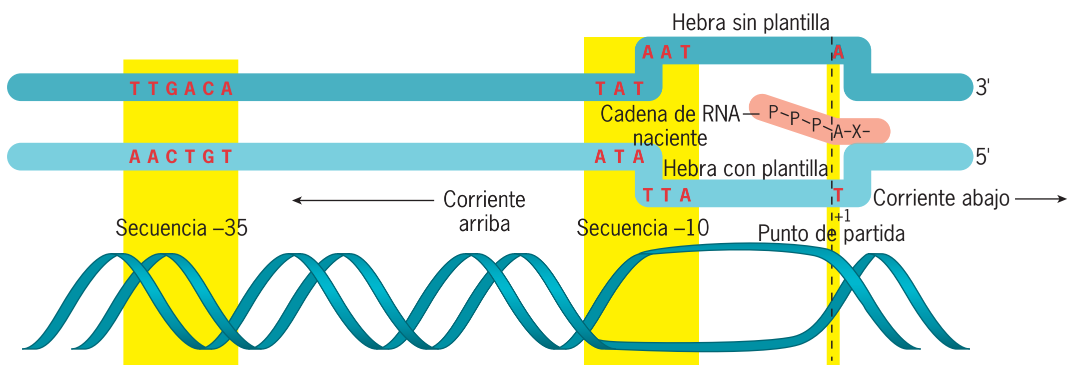



**FIGURA 11-7 Los elementos básicos de una región promotora en el DNA de la bacteria *E. coli*.** Las secuencias clave reguladoras requeridas para el inicio de la transcripción se encuentran en regiones ubicadas a –35 y –10 pares de bases desde el sitio en el que se inicia la transcripción. El sitio de inicio marca el límite entre los lados + y – del gen.

**TABLA 11-1 RNA polimerasas eucarióticas *nucleares***

| Enzima | RNA sintetizados |
|---|---|
| RNA polimerasa I | rRNA mayores (28S, 18S, 5.8S) |
| RNA polimerasa II | mRNA, la mayoría de los pequeños RNA nucleares (snRNA y snoRNA), la mayoría de los microRNA y el RNA telomerasa |
| RNA polimerasa III | Otros RNA pequeños, incluidos tRNA, 5SrRNA y U6snRNA |
| RNA polimerasa IV, V (sólo plantas) | siRNA |

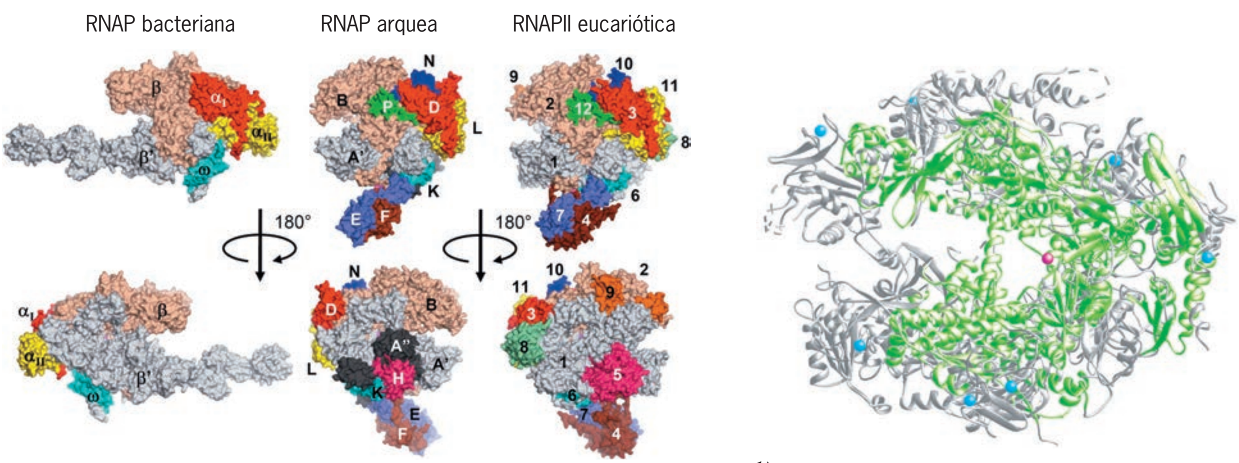
te que las enzimas arqueas y eucarióticas son más similares en estructura entre sí que las enzimas bacterianas y arqueas. Este rasgo refleja la relación evolutiva entre arqueas y eucariotas que se discutió con anterioridad en la sección 1.9. Las subunidades que componen cada una de las proteínas representadas en la figura 11-8*a*) están indicadas por un color diferente, y de inmediato es evidente que las RNA polimerasas son enzimas multisubunidad. Esas subunidades entre las diferentes enzimas que son homólogas entre sí (es decir, derivan de un polipéptido ancestral común) se muestran con el mismo color. Por tanto, también es evidente a partir de la figura 11-8*a*) que las RNA polimerasas de los tres dominios comparten varias subunidades. Aunque la enzima de levadura que se muestra en la figura 11-8a tiene un total de 12 subunidades –siete más que su homólogo bacteriano– la estructura central fundamental de las dos enzimas es prácticamente idéntica. Esta conservación evolutiva en la estructura de la RNA polimerasa se revela en la figura 11-8*b*), que muestra las regiones homólogas de las enzimas bacterianas y eucarióticas a una resolución mucho más alta.

Nuestra comprensión de la transcripción en eucariotas avanzó mucho más con la publicación en 2001 de la estructura cristalográfica de rayos X de la levadura RNA polimerasa II, por Roger Kornberg y colegas en la Universidad de Stanford. Como resultado de estos estudios, y los de otros laboratorios en años posteriores, ahora sabemos mucho sobre el mecanismo de acción de las RNA polimerasas a medida que se mueven a lo largo del DNA y transcriben una hebra complementaria de RNA. Una distinción importante entre la transcripción en las procariotas y las eucariotas es el requisito en las eucariotas de una gran variedad de proteínas accesorias o *factores de transcripción*. Estas proteínas desempeñan un papel en prácticamente todos los aspectos del proceso de transcripción, desde el enlace de la polimerasa a la plantilla del DNA y el inicio de la transcripción, hasta su elongación y terminación. Aunque los factores de transcripción son cruciales para el funcionamiento de los tres tipos de RNA polimerasa eucariotas, sólo se discutirán en relación a la síntesis de los mRNA por la RNA polimerasa II (página 418).

Los tres tipos principales de RNA eucariotas —mRNA, rRNA y tRNA— se derivan de moléculas de RNA precursoras que son considerablemente más largas que el producto RNA final. El RNA precursor inicial es equivalente en longitud a la longitud total del DNA transcrito, y se denomina **transcrito primario**, o **pre-RNA**. El segmento correspondiente de DNA a partir del cual se transcribe una transcripción primaria se denomina **unidad de transcripción**. Las transcripciones primarias no existen dentro de la célula como RNA desnudo, sino que se asocian con proteínas incluso cuando se sintetizan. Las transcripciones primarias suelen tener una existencia efímera, y se *procesan* a RNA funcionales más pequeños mediante una serie de reacciones de "cortar y pegar". El procesamiento del RNA requiere una variedad de RNA pequeños (de 90 a 300 nucleótidos de longitud) y sus proteínas asociadas. En las siguientes secciones, examinaremos las actividades asociadas con la transcripción y el procesamiento de cada uno de los RNA eucarióticos principales.

## REPASO

1. Describa los pasos durante el inicio de la transcripción en bacterias. ¿Cuál es el papel del factor σ? ¿Cuál es la naturaleza de la reacción en la que los nucleótidos se incorporan a una hebra de RNA en crecimiento? ¿Cómo se determina la especificidad de la incorporación de nucleótidos? ¿Cuál es el papel de la hidrólisis del pirofosfato?
2. ¿Cómo distingue el número de RNA polimerasas procariotas y eucariotas? ¿Cuál es la relación entre un pre-RNA y un RNA maduro?




*a*) *b*)

**FIGURA 11-8 Comparación entre las estructuras procariota y eucariota de la RNA polimerasa.** *a*) RNA polimerasas de los tres dominios de la vida. Cada subunidad de una enzima se indica con un color diferente, y se etiqueta de acuerdo con la nomenclatura convencional para esa enzima. Las subunidades homólogas están representadas por el mismo color. Se puede ver que las polimerasas arqueas y eucarióticas son más similares en estructura entre sí que las enzimas bacterianas y eucariotas. La RNA polimerasa II (mostrada aquí) es sólo una de las tres principales RNA polimerasas eucariotas nucleares. *b*) Diagrama de cinta de la estructura central de la levadura RNA polimerasa II. Las regiones de la polimerasa bacteriana que son estructuralmente homólogas a la enzima de la levadura se muestran en verde. Se aprecia el gran canal que agarra el DNA corriente abajo. Un ion divalente $Mg^{2+}$, situado al final del canal y dentro del sitio activo, se ve como una esfera roja.

FUENTE: *a*) Akira Hirata, Brianna J. Klein, y Katsuhiko S. Murakami, *Nature* 2008;451:852, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.; *b*) De Patrick Cramer, *et al*. *Science* 2001;292:1874, fig. 12b. © 2001, reimpreso con permiso de AAAS. Cortesía de Roger Kornberg, Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford.

## 11.4 Síntesis y procesamiento de ribosomas eucariotas y RNA de transferencia

Una célula eucariota puede contener millones de ribosomas, cada uno compuesto por varias moléculas de rRNA junto con docenas de proteínas ribosomales. La composición de un ribosoma de mamífero se muestra en la **FIGURA 11-9**. Los ribosomas son tan numerosos que más de 80% del RNA en la mayoría de las células consiste en RNA ribosómico. Para proporcionar a la célula un número tan grande de transcripciones, las secuencias de DNA que codifican el rRNA normalmente se repiten cientos de veces. Este DNA, llamado rDNA, por lo general está agrupado en una o unas pocas regiones del genoma. El genoma humano tiene cinco clústeres de **rDNA**, cada uno en un cromosoma diferente. En una célula no divisoria (interfase), los clústeres de rDNA se reúnen como parte de una o más estructuras nucleares de forma irregular llamadas **nucléolos**, que funcionan en la producción de ribosomas (véase **FIGURA 11-10*a***).

La mayor parte de un nucléolo se compone de subunidades ribosomales nacientes, que le dan al nucléolo una apariencia granular (consúltese figura 11-10*b*). Incrustados dentro de esta masa granular se encuentran uno o más núcleos redondeados que son principalmente material fibrilar. Como se discute en la leyenda de la figura 11-10, se cree que el material fibrilar consiste en plantillas de rDNA y transcriptos nacientes de rRNA. En las siguientes secciones, examinaremos el proceso mediante el cual se sintetizan estas transcripciones de rRNA.

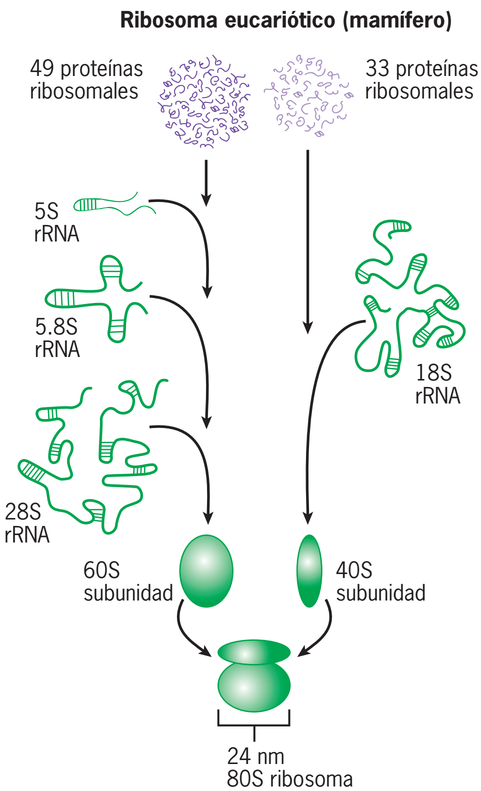
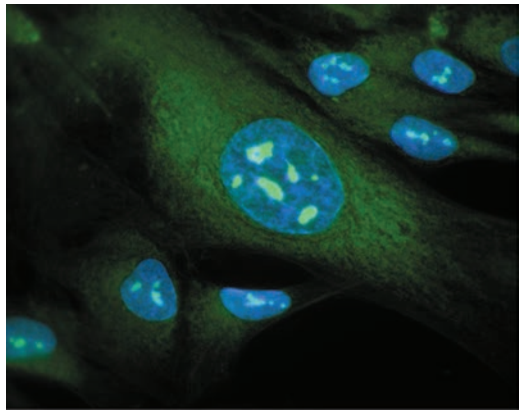
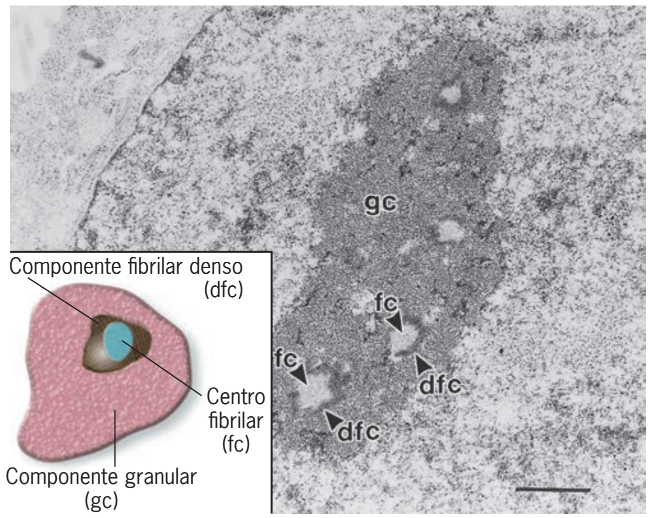



**FIGURA 11-9 Composición macromolecular de un ribosoma de mamífero.** Este dibujo esquemático muestra los componentes presentes en cada una de las subunidades de un ribosoma de mamífero. La síntesis y el procesamiento de los rRNA y el ensamblaje de las subunidades ribosomales se discuten en las siguientes páginas.

FUENTE: DP Snustad, *et al. Principles of Genetics*; Copyright © 1997, John Wiley & Sons, Inc., reimpreso con permiso de John Wiley & Sons, Inc.



*a*)




*b*)

**FIGURA 11-10 El nucléolo.** *a*) Micrografía óptica de células de fibroblastos de pulmón humano teñidas con un colorante fluorescente que se une al RNA. Los núcleos (resaltados en azul con un tinte de DNA fluorescente azul) contienen nucléolos múltiples, fábricas en las que se producen ribosomas y que están enriquecidas tanto en RNA ribosómico como en proteínas ribosomales. *b*) Micrografía electrónica de una sección de una parte de un núcleo con un nucléolo. Tres regiones nucleolares distintas se pueden distinguir morfológicamente. La mayor parte del nucléolo consiste en componente granular (gc, *granular component*), que contiene subunidades ribosomales en diversas etapas de ensamblaje. Incrustadas dentro de las regiones granulares se encuentran los centros fibrilares (fc, *fibrillar centers*) que están rodeados por un componente fibrilar más denso (dfc, *dense fibrillar component*). El recuadro muestra un dibujo esquemático de estas partes del nucléolo. De acuerdo con un modelo, el fc contiene el DNA que codifica el RNA ribosomal, y el dfc contiene los transcriptos de rRNA prenatal y las proteínas asociadas. Según este modelo, la transcripción del precursor pre-rRNA tiene lugar en el límite entre el fc y el dfc. (*Nota:* Los nucléolos tienen otras funciones no relacionadas con la biogénesis de los ribosomas que no se analizan en este texto). Barra, 1 µm.

FUENTE: *a*) Cortesía de Thermo Fisher Scientific; *b*) De Pavel Hozak, *et al. J Cell Science* 1994;107:646. Reproducido con permiso de The Company of Biologists Ltd. http://jcs.biologists.org/content/107/2/639.full.pdf+html?sid=8e44240f-086-bea-bef4-b79b866c0261

### Síntesis y procesamiento del precursor rRNA

Los ribosomas eucarióticos tienen cuatro RNA ribosómicos distintos, tres en la subunidad grande y uno en la subunidad pequeña. En los humanos la subunidad grande contiene una molécula de RNA 28S, 5.8S y 5S, y la subunidad pequeña contiene una

molécula de RNA 18S.[1] Tres de estos rRNA (28S, 18S y 5.8S) están conformados por varias nucleasas de un único transcripto primario (llamado el **pre-rRNA**) que es sintetizado por una enzima llamada RNA polimerasa I, que se especializa en transcribir el pre-rRNA. El 5S rRNA se sintetiza a partir de un precursor separado de RNA, fuera del nucléolo, mediante una enzima diferente llamada RNA polimerasa III. Comenzaremos nuestra discusión sobre el procesamiento del rRNA con el pre-rRNA.

Dos de las peculiaridades del pre-rRNA, en comparación con otros transcriptos de RNA, son la gran cantidad de nucleótidos metilados y residuos de pseudouridina. En el momento que un precursor de rRNA humano se divide por primera vez, ya se han agregado más de 100 grupos metilo a los grupos ribosa en la molécula, y aproximadamente 95 de sus residuos de uridina se han convertido por vía enzimática a pseudouridina (véase figura 11-13*a*). Todas estas modificaciones ocurren después de que los nucleótidos se incorporan al RNA naciente; es decir, *postranscripcionalmente.* Los nucleótidos alterados están ubicados en posiciones específicas, y están agrupados dentro de porciones de la molécula que se han conservado entre organismos. Todos los nucleótidos en el pre-rRNA que han sido alterados permanecen como parte de los productos finales, mientras que las secciones inalteradas se descartan durante el proceso. Las funciones de los grupos metilo y pseudouridinas no están claras. Estos nucleótidos modificados pueden proteger partes del pre-rRNA de la división enzimática, promover el plegamiento de los rRNA en sus estructuras tridimensionales finales o promover interacciones de los rRNA con otras moléculas.

[1] El valor S (o unidad Svedberg) se refiere al coeficiente de sedimentación del RNA; cuanto mayor sea el número, más rápidamente se moverá la molécula a través de un campo de fuerza durante la centrifugación, y (para un grupo de moléculas químicamente similares) mayor será el tamaño de la molécula. Los RNA 28S, 18S, 5.8S y 5S consisten en longitudes de nucleótidos de aproximadamente 5 000, 2 000, 160 y 120 nucleótidos respectivamente.

Debido a que los rRNA están tan fuertemente metilados, su síntesis se puede estudiar incubando células con metionina marcada radiactivamente, un compuesto que sirve en la mayoría de las células como un donante de grupo metilo. El grupo metilo se transfiere enzimáticamente de la metionina a los nucleótidos en el rRNA previo. Cuando se proporciona metionina $^{14}$C a células de mamífero cultivadas durante un corto periodo, una fracción considerable de la radiactividad incorporada está presente en una molécula de RNA 45S, de longitud igual a unos 13 000 nucleótidos. El RNA 45S se divide en moléculas más pequeñas que luego se recortan a moléculas de rRNA 28S, 18S y 5.8S. La longitud combinada de los tres rRNA maduros es de alrededor de 7 000 nucleótidos, o un poco más de la mitad del transcripto primario.

Algunos de los pasos en la ruta de procesamiento desde el rRNA previo 45S hasta los rRNA maduros se pueden estudiar incubando células de mamífero muy brevemente con metionina marcada; luego se rastrean las células en un medio no marcado durante periodos variables (véase **FIGURA 11-11**). (Este tipo de experimento de "pulso-persecución" se discutió en la página 260). Como se indicó anteriormente, la primera especie en etiquetarse

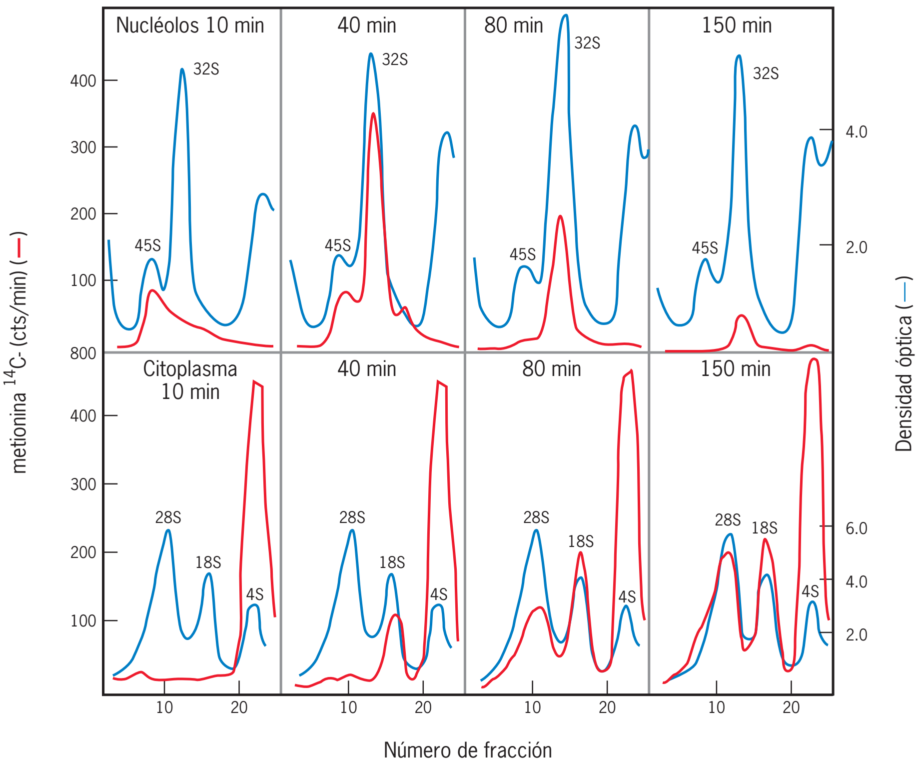



**FIGURA 11-11 Análisis cinético de la síntesis y procesamiento de rRNA.** Un cultivo de células de mamífero se incubó durante 10 minutos en metionina $^{14}$C y luego se rastreó en varios intervalos en un medio sin marcar, como se indica en cada panel. Después del rastreo, las células se lavaron libres de isótopos y se homogeneizaron, y se prepararon fracciones nucleolares y citoplásmicas. El RNA se extrajo de cada fracción y se analizó por sedimentación en un gradiente de densidad de sacarosa. Como se discutió en la sección 18.10, esta técnica separa los RNA según el tamaño (cuanto mayor es el tamaño, más cerca está el RNA del fondo del tubo, que corresponde a la fracción 1). La línea azul continua representa la absorbancia UV de cada fracción celular, que proporciona una medida de la cantidad de RNA de cada clase de tamaño. Este perfil de absorbancia no cambia con el tiempo. La línea roja continua muestra la radiactividad varias veces durante el rastreo. Los gráficos de RNA nucleolar (perfiles superiores) muestran la síntesis del precursor de rRNA 45S y su posterior conversión a una molécula 32S, que es un precursor de los rRNA 28S y 5.8S. El otro producto principal del precursor 45S abandona el núcleo muy rápidamente y, por tanto, no aparece en forma prominente en el RNA nucleolar. Los perfiles inferiores muestran el curso temporal de la aparición de las moléculas maduras de rRNA en el citoplasma. El rRNA 18S aparece en el citoplasma mucho antes que la especie 28S más grande, lo que se correlaciona con el rápido éxodo de la primera desde el nucléolo.

FUENTE: H. Greenberg y S. Penman. *J Mol Biol* 1966;21:531; Copyright 1966, con permiso del editor Academic Press.

en este tipo de experimento es el transcripto primario 45S, que se ve como un pico de radiactividad (línea roja) en la fracción de RNA nucleolar tras 10 minutos. Después de aproximadamente una hora, el RNA 45S ha desaparecido del nucléolo, y un RNA 32S lo reemplaza en gran parte, que es uno de los dos principales productos obtenidos a partir del guion primario de transcripción 45S. El RNA 32S se ve como un pico distinto en la fracción nucleolar de 40 a 150 minutos. El RNA 32S es un precursor de los rRNA maduros 28S y 5.8S. El otro producto principal del pre-rRNA 45S deja el nucléolo bastante rápidamente y aparece en el citoplasma como rRNA maduro 18S (visto en la fracción citoplásmica de 40 minutos). Después de un periodo de dos o más horas, casi toda la radiactividad ha salido del nucléolo, y la mayoría se ha acumulado en los rRNA 28S y 18S del citoplasma. La radiactividad en el pico de RNA 4S incluye el rRNA 5.8S, así como los grupos metilo que se han transferido a moléculas pequeñas de tRNA. La **FIGURA 11-12** muestra una ruta probable en el procesamiento de un transcripto primario de rRNA.

## Papel de los snoRNA en el procesamiento del pre-rRNA

El procesamiento del pre-rRNA se logra con la ayuda de un gran número de **RNA nucleolares pequeños** (o **snoRNA**) que están empaquetados con proteínas particulares para formar partículas llamadas **ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas** (o **snoRNP, *small, nucleolar RNA***). Las micrografías de electrones indican que las snoRNP comienzan a asociarse con el precursor del rRNA antes de que se transcriba por completo. La primera partícula RNP en unirse a una transcripción pre-rRNA contiene el U3 snoRNA y más de dos docenas de proteínas diferentes. Este gran componente de la maquinaria de procesamiento de rRNA cataliza la eliminación del extremo 5′ de la transcripción (obsérvese figura 11-12). Se cree que algunas de las otras divisiones en-

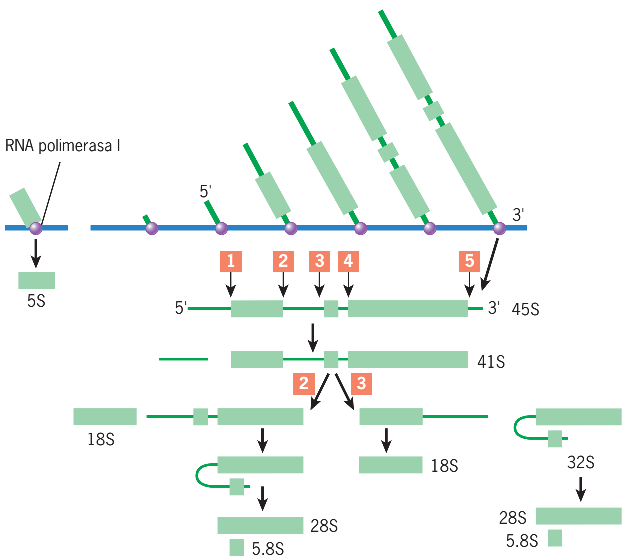



**FIGURA 11-12 Un esquema propuesto para el procesamiento de RNA ribosómico de mamífero.** La transcripción primaria para los rRNA es una molécula 45S de aproximadamente 13 000 bases. Los principales eventos de división durante el procesamiento de este pre-rRNA están indicados por los números encasillados. La división del transcripto primario en los sitios 1 y 5 elimina las secuencias transcriptas exteRNA 5′ y 3′ y produce un intermedio 41S. Las segundas divisiones pueden ocurrir en el sitio 2 o en el 3, en dependencia del tipo de célula. La división en el sitio 3 genera el intermedio 32S visto en las curvas de la figura anterior. Durante los pasos finales del procesamiento, las secciones 28S y 5.8S están separadas entre sí, y los extremos de los diversos intermedios se recortan hasta su tamaño final.
FUENTE: Tras de RP Perry, *J. Cell Biol.* 91:29s, 1981; con el permiso de Copyright de la Rockefeller University Press.

zimáticas indicadas en la figura 11-12 están catalizadas por el "exosoma", que es una máquina de degradación de RNA que consiste en casi una docena de exonucleasas diferentes.

El U3 y varios otros snoRNA se identificaron hace años porque están presentes en grandes cantidades (aproximadamente $10^6$ copias por célula). Con posterioridad se descubrió una clase diferente de snoRNA presentes en una concentración más baja (aproximadamente $10^4$ copias por célula). Estos snoRNA poco abundantes se pueden dividir en dos grupos, de acuerdo a su función y similitudes en la secuencia de nucleótidos. Los miembros de un grupo (llamados *snoRNA de caja C/D*) determinan cuáles nucleótidos en el pre-rRNA tendrán sus partes de ribosa metiladas, mientras que los miembros del otro grupo (llamados *snoRNA* de *caja H/ACA*) determinan cuáles uridinas se convierten en pseudouridinas. Las estructuras de los nucleótidos modificados por estas dos reacciones se muestran en la **FIGURA 11-13*a***.

Ambos grupos de snoRNA contienen tramos relativamente largos (de 10 a 21 nucleótidos) que son complementarios a secciones del rRNA transcripto. Estos snoRNA proporcionan un excelente ejemplo del principio de que los ácidos nucleicos de hebra simple, que tienen secuencias de nucleótidos complementarias, son capaces de formar híbridos de hebra doble. En este caso, cada snoRNA se une a una porción específica del pre-rRNA para formar un dúplex de RNA-RNA. El snoRNA unido guía una enzima —ya sea una metilasa o una pseudouridilasa— dentro del snoRNP para modificar un nucleótido particular en el pre-rRNA. Tomados en conjunto hay aproximadamente 200 snoRNA diferentes, uno para cada sitio en el pre-rRNA que es ribosa-metilado o pseudouridilado. Si se elimina el gen que codifica uno de estos snoRNA, uno de los nucleótidos del pre-rRNA no se modifica enzimáticamente. El mecanismo de acción de los dos tipos de snoRNA se ilustra en la figura 11-13*b*,*c*).

El nucléolo es el sitio no sólo de procesamiento de rRNA, sino también de ensamblaje de las dos subunidades ribosomales. Se han encontrado más de 200 proteínas diferentes asociadas con los rRNA en diferentes etapas del ensamblaje de ribosomas. Estas proteínas se pueden dividir en dos grupos: las proteínas ribosomales que permanecen en las subunidades, y las proteínas accesorias que tienen una interacción transitoria con los intermediarios del rRNA y sólo se requieren para el procesamiento. Entre este último grupo se encuentran más de una docena de helicasas de RNA, que son enzimas que desenrollan las regiones de RNA de doble hebra. Estas enzimas están supuestamente involucradas en los muchos reordenamientos estructurales que ocurren durante la formación del ribosoma, incluida la disociación de los snoRNA de las partículas pre-ribosomales.

## Síntesis y procesamiento del rRNA 5S

Un rRNA 5S, de aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, está presente como parte de la gran subunidad ribosomal, en ambas procariotas y eucariotas. En las eucariotas, las moléculas de rRNA 5S están codificadas por una gran cantidad de genes idénticos, que están separados de los otros genes de rRNA y se encuentran fuera del nucléolo. Después de su síntesis, el rRNA 5S se transporta al nucléolo para unir los otros componentes implicados en el ensamblaje de las subunidades ribosomales.

Los genes 5S rRNA son transcriptos por la RNA polimerasa III. La RNA polimerasa III es inusual entre las tres polimerasas porque se puede unir a un sitio promotor localizado dentro de la porción transcrita del gen blanco.[2] La posición interna del promotor se demostró por primera vez al introducir genes de rRNA

[2] La RNA polimerasa III transcribe varios RNA diferentes. Se enlaza a un promotor interno cuando transcribe un RNA pre-5S o un pre-tRNA, pero se enlaza a un promotor de corriente arriba cuando transcribe los precursores para varios otros, incluyendo el U6 snRNA.

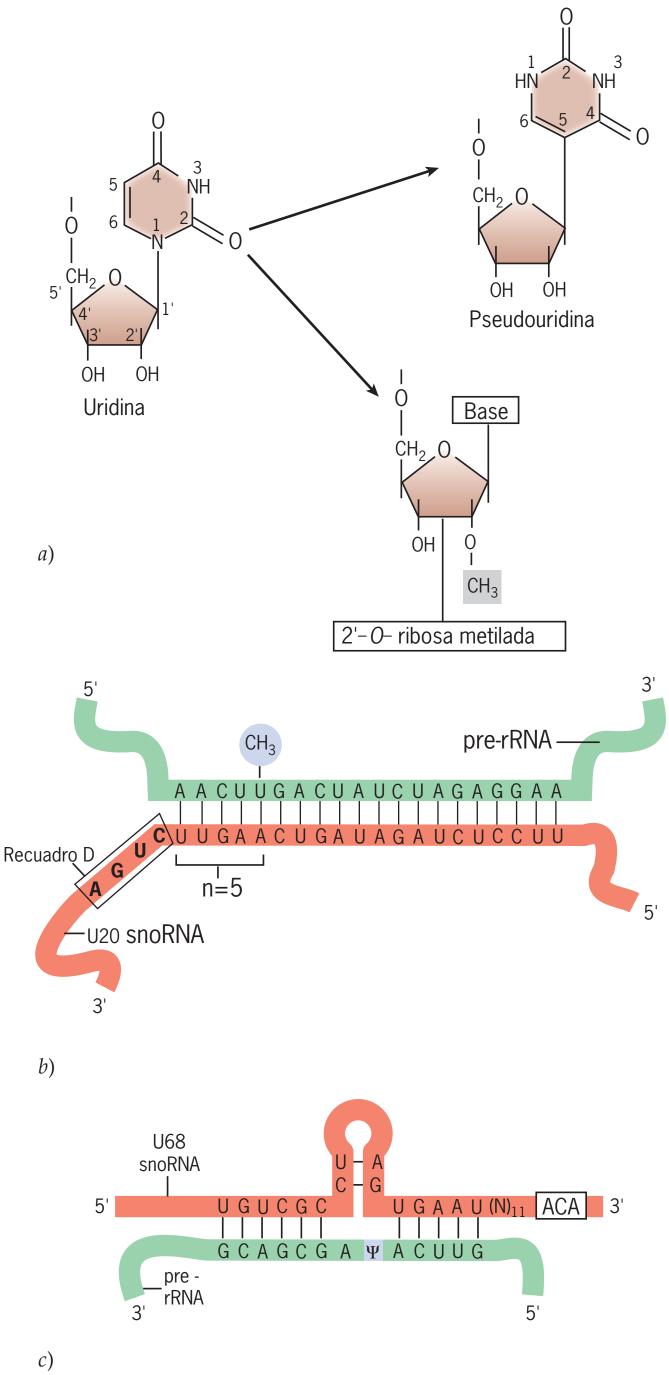



**FIGURA 11-13 Modificación del pre-rRNA.** *a*) Las modificaciones más frecuentes a los nucleótidos en un pre-rRNA son la conversión (isomerización) de una uridina a una pseudouridina y la metilación de una ribosa en el sitio 2′ del azúcar. Para convertir la uridina en pseudouridina, el enlace N1-C1′ se divide, y el anillo de uracilo rota en 120°, lo que coloca el C5 del anillo en su lugar para formar el nuevo enlace con el C1′ de la ribosa. Un componente de proteína de los snoRNP llamado disquerina cataliza estas modificaciones químicas. *b*) La formación de un dúplex de RNA-RNA entre el U20 snoRNA y una porción del rRNA previo que conduce a la metilación de la 2′ ribosa. En cada caso, el nucleótido metilado en el rRNA está unido por hidrógeno a un nucleótido del snoRNA, que está localizado en cinco pares de bases del recuadro D. El recuadro D, que contiene la secuencia invariable CUGA, está presente en todos los snoRNA que guían la metilación de la ribosa. *c*) La formación de un dúplex de RNA-RNA entre el U68 snoRNA y una porción del pre-rRNA que conduce a la conversión de una uridina en pseudouridina (Ψ). La pseudouridilación se produce en un sitio fijo en relación con un pliegue en horquilla en el snoRNA. Los snoRNA que guían la pseudouridilación tienen una secuencia de ACA común.

FUENTE: *b*) Por JP Bachellerie y J. Cavaillé. *Trends in Bioch Sci*. 1997;22:258; Copyright 1997, con permiso de Elsevier Science; *c*) Por P Ganot, *et al*. *Cell* 1997;89:802.

5S modificados en las células hospederas, y determinar la capacidad de ese DNA para servir como plantillas para la polimerasa III del huésped. Se descubrió que la región flanqueante 5′ completa podría eliminarse y la polimerasa aún transcribiría el DNA comenzando en el sitio de inicio normal. Sin embargo, si la deleción incluía la parte central del gen, la polimerasa no transcribiría el DNA ni se uniría a él. Si el promotor interno de un gen 5S rRNA se inserta en otra región del genoma, el nuevo sitio se convierte en una plantilla para la transcripción por la RNA polimerasa III.

## Los RNA de transferencia

Se estima que las células vegetales y animales tienen aproximadamente 50 especies diferentes de RNA de transferencia, cada especie codificada por una secuencia repetida de DNA. El grado de repetición varía con el organismo: las células de levadura tienen un total de aproximadamente 275 genes de tRNA, las moscas de la fruta alrededor de 850 y los humanos alrededor de 1 300. Los RNA de transferencia se sintetizan a partir de genes que se encuentran en pequeños grupos diseminados por el genoma. Un solo grupo suele contener múltiples copias de genes *diferentes* de tRNA, y a la inversa, la secuencia de DNA que codifica un tRNA dado suele encontrarse en más de un grupo. El DNA dentro de un grupo (*tDNA*) consiste en gran parte de secuencias espaciadoras no transcritas con las secuencias codificantes de tRNA situadas a intervalos irregulares en una disposición repetida en tándem (consúltese **FIGURA 11-14**).

Al igual que el 5S rRNA, los tRNA se transcriben mediante la RNA polimerasa III y la secuencia promotora se encuentra dentro de la sección de codificación del gen, en lugar de ubicarse en su flanco 5′. La transcripción primaria de una molécula de RNA de transferencia es mayor que el producto final, y las piezas en los lados 5′ y 3′ del tRNA precursor (y una pequeña pieza interior en algunos casos) se deben recortar. Además, se deben modificar numerosas bases (véase figura 11-40). Una de las enzimas involucradas en el procesamiento del pre-tRNA es una endonucleasa llamada ribonucleasa P, que está presente tanto en células bacterianas como eucarióticas, y consta de subunidades de RNA y proteína. Es la subunidad de RNA de la ribonucleasa P quien cataliza la división del sustrato pre-tRNA, un tema tratado en "Vías experimentales" en la página 450.

## REPASO

1. Describa las diferencias entre una transcripción primaria, una unidad de transcripción, un espaciador transcripto y un rRNA maduro.
2. Dibuje una representación de una micrografía electrónica de rDNA que se está transcribiendo. Marque el espaciador no transcripto, el espaciador transcripto, las moléculas de RNA polimerasa, el U3 snRNP y el promotor.
3. Compare la organización de los genes que codifican los grandes rRNA y los tRNA dentro del genoma de los vertebrados.

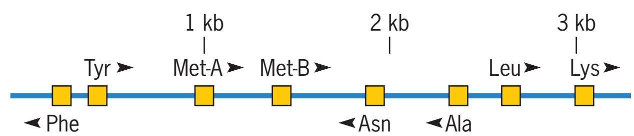



**FIGURA 11-14 Disposición de los genes que codifican la transferencia de RNA en *Xenopus*.** Un fragmento de DNA de 3.18 kilobases, que muestra el arreglo de varios genes y espaciadores tRNA.

FUENTE: SG Clarkson y otros, en DD Brown (ed.). *Developmental Biology Using Purified Genes*, Academic Press; 1981.

# 11.5 Síntesis y estructura de los RNA mensajeros eucarióticos

El primer paso en la expresión del DNA como proteína es sintetizar el RNA mensajero capaz de llevar las instrucciones genéticas desde el núcleo al citoplasma. La transcripción del RNA comienza cuando el RNA polimerasa se enlaza al DNA en la región llamada promotor. Un grupo de proteínas conocidas como factores generales de transcripción facilitan el proceso.

## Formación de RNA nuclear heterogéneo (hnRNA)

Cuando las células eucariotas se incuban durante un corto periodo en [$^3$H]uridina o [$^{32}$P]fosfato y de inmediato mueren, la mayor parte de la radiactividad se incorpora a moléculas de RNA que poseen las siguientes propiedades: 1) tienen grandes pesos moleculares (hasta aproximadamente 80S, o 50 000 nucleótidos); 2) como grupo, están representadas por RNA de secuencia de nucleótidos diversa (heterogénea), y 3) sólo se encuentran en el núcleo. Es por dichas propiedades que estos RNA se denominan **RNA nucleares heterogéneos (*nhRNA*, *heterogeneous nuclear RNA*)**, y se indican mediante la línea roja de radiactividad en la **FIGURA 11-15*a***). Cuando las células que se han incubado en [$^3$H]uridina o [$^{32}$P]fosfato para un pulso breve se colocan en un medio sin marcar, se rastrean durante varias horas antes de que se eliminen, y se extrae el RNA, la cantidad de radiactividad en los grandes RNA nucleares cae bruscamente, y aparece en cambio en los mRNA mucho más pequeños que se encuentran en el citoplasma (línea roja de la figura 11-15*b*). Estos primeros experimentos, que comenzaran James Darnell, Jr., Klaus Scherrer y sus colegas, sugirieron que los grandes y rápidamente etiquetados hnRNA eran principalmente precursores de los mRNA citoplásmicos más pequeños. Esta interpretación ha sido totalmente confirmada por gran cantidad de investigaciones.

Es importante notar que las líneas azules y rojas en la figura 11-15 siguen un curso muy diferente. Las líneas azules, que indican la densidad óptica (es decir, la absorbancia de la luz UV) de cada fracción, proporcionan información sobre la cantidad de RNA en cada fracción después de la centrifugación. Las líneas azules muestran que la mayoría del RNA de la célula está presente como rRNA 18S y 28S (junto con varios RNA pequeños que permanecen cerca de la parte superior del tubo). Las líneas rojas, que indican la radiactividad en cada fracción, proporcionan información sobre el número de nucleótidos activos por radio incorporados en el RNA de diferentes tamaños durante el pulso breve. En estos gráficos se puede apreciar que ni el hnRNA (obsérvese figura 11-15*a*) ni el mRNA (obsérvese figura 11-15*b*) constituyen una fracción significativa del RNA en la célula. Si lo hicieran, habría una mayor correlación entre las líneas azul y roja. Por tanto, aunque los mRNA (y sus precursores de RNA nuclear heterogéneos) constituyen sólo un pequeño porcentaje del RNA total de la mayoría de las células eucarióticas, ellos constituyen un gran porcentaje del RNA que está sintetizando esa célula en un momento dado (consúltese figura 11-15). La razón de que haya poca o ninguna evidencia de los hnRNA y los mRNA en las gráficas de densidad óptica de la figura 11-15 es que estos RNA se degradan después de periodos relativamente breves. Esto es particularmente cierto de los hnRNA, que se procesan a mRNA (o se degradan completamente) incluso cuando se están sintetizando. Por el contrario, los rRNA y tRNA tienen vidas medias que se miden en días o semanas, y se acumulan gradualmente para convertirse en la especie predominante en la célula. Se puede observar cierta acumulación de radiactividad en los rRNA maduros 28S y 18S después de un rastreo de 3 horas (véase figura 11-15*b*). La vida media de los mRNA cambia en dependencia de la especie particular, que varía desde unos 15 minutos hasta un periodo de días.

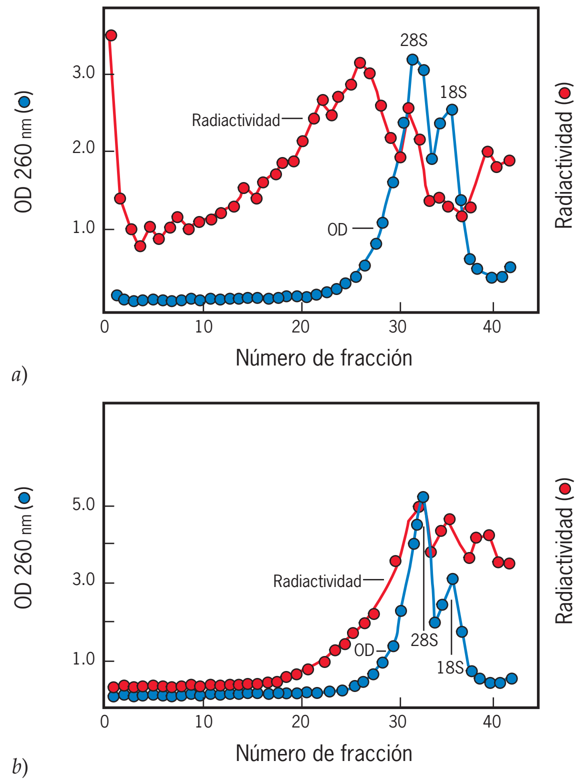



**FIGURA 11-15 Formación de RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) y su conversión en mRNA más pequeños.** *a*) Curvas que muestran el patrón de sedimentación de RNA total extraído de células de sangre de pato después de la exposición al [$^{32}$P]fosfato durante 30 minutos. Cuanto más grande sea el RNA, más lejos se desplazará durante la centrifugación, y más cerca estará del final del tubo. La absorbancia (línea azul) indica la cantidad total de RNA en diferentes regiones del tubo de centrífuga, mientras que la línea roja indica la radiactividad correspondiente. Es evidente que la mayor parte del RNA recién sintetizado es muy grande, mucho más grande que los rRNA 18S y 28S estables. Estos RNA grandes son los hnRNA. *b*) Los perfiles de absorbancia y radiactividad del RNA se extrajeron de las células que se marcaron por pulso durante 30 minutos como en la parte *a*, pero luego se rastrearon durante 3 horas en presencia de actinomicina D, lo que impide la síntesis adicional de RNA. Se aprecia que los hnRNA grandes se han procesado a productos de RNA más pequeños.

FUENTE: G. Attardi, *et al. J Mol Biol* 1966;20:160; Copyright 1966, con permiso del editor de Academic Press.

## La maquinaria para la transcripción del mRNA

La RNA polimerasa II sintetiza todos los precursores de mRNA eucariótico; es una enzima compuesta por una docena de subunidades diferentes que se conserva notablemente desde la levadura hasta los mamíferos. La RNA polimerasa II se une al promotor con la cooperación de varios **factores generales de transcripción (GTF, *general transcription factors*)** para formar un *complejo de preinicio* (*PIC, preinitiation complex*). Estas proteínas se denominan factores generales de transcripción porque se requieren las mismas para el inicio preciso de la transcripción de una diversidad de genes en una amplia variedad de organismos diferentes. Los elementos promotores que nuclean el ensamblaje del PIC se encuentran en el lado 5′ de cada unidad de transcripción, aunque la enzima hace contacto con el DNA en ambos lados del sitio de inicio de la transcripción (véase **FIGURA 11-16*b***). Restringiremos la discusión a los mejores promotores estudiados, que son aquellos asociados con genes altamente específicos expresados en la testosterona, como el gen de la ovoalbúmina, que codifica la clara de un huevo de gallina, y los genes de globina, que codifican los polipéptidos de la hemoglobina. Una porción crítica del promotor de dichos genes se encuentra entre 24 y 32 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción (véase figura 11-16*a*). Esta

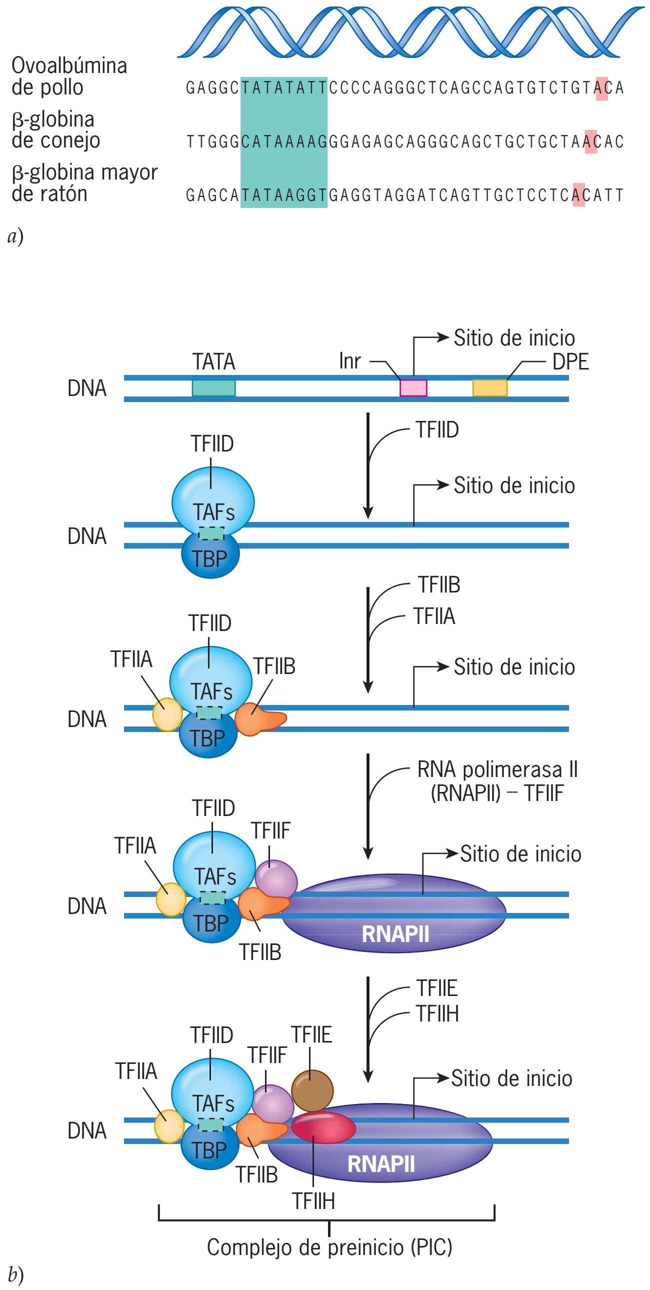



**FIGURA 11-16 Inicio de la transcripción de un promotor de polimerasa II eucariota.** *a*) Secuencia de nucleótidos de la región, justo corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción en tres genes eucariotas diferentes. La caja TATA está indicada por el sombreado azul. Muchos promotores eucariotas contienen un segundo elemento promotor central conservado llamado iniciador (Inr, *initiator*), que incluye el sitio donde se inicia la transcripción (se muestra en naranja). Otros elementos promotores se representan en la figura 12-45. Se debe observar que 1) la mayoría de los promotores eucarióticos carecen de una caja TATA reconocible y 2) muchos otros elementos promotores, por ejemplo, el DPE mostrado en la parte *b*), se han identificado estar corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción. Diferentes genes contienen diferentes combinaciones de elementos promotores, de modo que sólo se requiere un subconjunto para nuclear el ensamblaje de PIC. *b*) Modelo altamente esquemático de los pasos en el ensamblaje del complejo de preinicio para la RNA polimerasa II. La polimerasa en sí misma se denomina RNAPII; los otros componentes son los diversos factores generales de transcripción requeridos en el ensamblaje del complejo completo. El TFIID incluye la subunidad TBP, que se une específicamente a la caja TATA, y una serie de otras subunidades que colectivamente se denominan factores asociados a TBP (TAF). Se cree que el TFIIB proporciona un sitio de unión para la RNA polimerasa. El TFIIF, que contiene una subunidad homóloga al factor bacteriano σ, se une a la polimerasa entrante. El TFIIH contiene 10 subunidades, 3 de las cuales poseen actividades enzimáticas.

región a menudo contiene una secuencia consenso que es, o bien idéntica, o muy similar al oligonucleótido 5′-TATAAA-3′ y se conoce como la caja TATA.

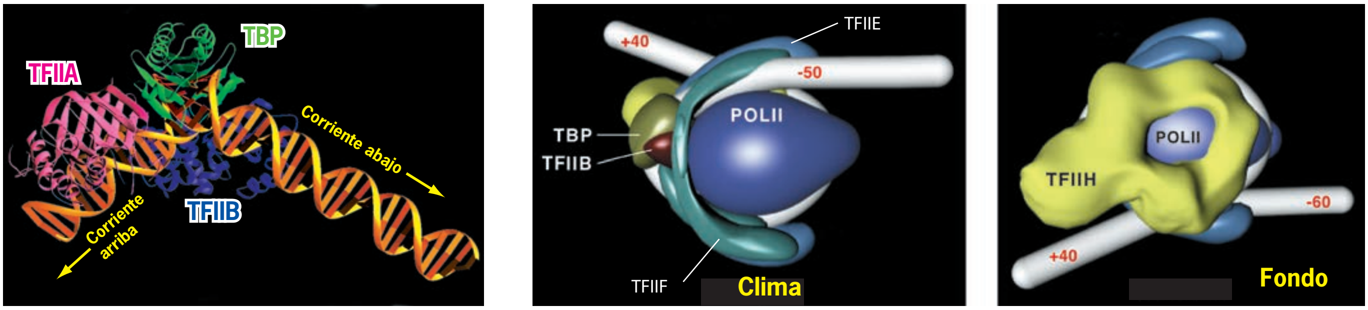
El primer paso en el ensamblaje del complejo de preinicio es la unión de una proteína, llamada *proteína enlazante TATA* (*TBP*), que reconoce la caja TATA de estos promotores (consúltese figura 11-16*b*). Por tanto, como en las células bacterianas, una polimerasa eucariota purificada no puede reconocer un promotor directamente, y no puede iniciar una transcripción precisa por sí misma. La TBP está presente como una subunidad de un complejo proteico mucho más grande llamado TFIID.[3] La cristalografía de rayos X ha revelado que la unión de TBP a un promotor de la polimerasa II causa una distorsión espectacular en la conformación del DNA. Como se muestra en la **FIGURA 11-17*a***, la TBP se inserta en el surco menor de la doble hélice, doblando la molécula de DNA más de 80° en el sitio de la interacción DNA-proteína. Mientras que el TBP se une a la TATA, otras subunidades del complejo TFIID se unen a otras regiones del DNA, incluidos los elementos que se encuentran corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción.

El enlace del TFIID establece el escenario para el ensamblaje completo del complejo de preinicio, que se piensa que ocurre de una forma paso a paso, como se muestra en la figura 11-16*b*). La interacción de tres de los GTF (TBP de TFIID, TFIIA y TFIIB) con el DNA se muestra en la figura 11-17*a*. La presencia de estos tres GTF unidos al promotor proporciona una plataforma para la posterior unión de la enorme RNA polimerasa de múltiples subunidades con su TFIIF adjunto (véase figura 11-16*b*). Una vez que la RNA polimerasa-TFIIF está en posición, otro par de GTF (TFIIE y TFIIH) se unen al complejo y transforman la polimerasa en una activa máquina de transcripción. En la figura 11-17*b*) se muestra un modelo tridimensional del complejo de preinicio.

El TFIIH es el único GTF conocido por poseer actividades enzimáticas. Una de las subunidades de TFIIH funciona como una proteína quinasa para fosforilar la RNA polimerasa (se discute a continuación), mientras que otras dos subunidades de este complejo de proteína funcionan como enzimas del despliegue del DNA (helicasas). Se requiere la actividad de la helicasa en el DNA para separar las hebras de DNA del promotor y permitir que la hebra de plantilla encuentre su camino en el sitio activo de la polimerasa. Una vez que comienza la transcripción, algunos de los GTF (incluido el TFIID) se pueden dejar atrás en el promotor, mientras que otros se liberan del complejo (**FIGURA 11-18**). Mientras que el TFIID permanezca unido al promotor, las moléculas adicionales de RNA polimerasa se pueden unir al sitio del promotor, e iniciar rápidamente rondas adicionales de transcripción.

El dominio carboxilo terminal (CTD, *carboxyl-terminal domain*) de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II tiene una estructura inusual; consiste en una secuencia de siete aminoácidos (-Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7-) que se repite una y otra vez. En humanos el CTD consiste en 52 repeticiones de este heptapéptido. Los siete residuos del heptapéptido se pueden modificar enzimáticamente de una manera u otra; limitaremos la discusión a las serinas dos y cinco, que son los principales candidatos para la fosforilación por las proteínas quinasas. La RNA polimerasa que se ensambla en el complejo de preinicio no está fosforilada, mientras que la misma enzima que participa en la transcripción está fuertemente fosforilada; todos los grupos de fosfato añadidos están localizados en el CTD (consúltese figura 11-18). Al menos

[3] El TBP es en realidad un factor de transcripción universal que media la unión de las tres RNA polimerasas eucariotas. El TBP está presente como una de las subunidades de tres complejos proteicos diferentes. Como una subunidad de TFIID, el TBP promueve el enlace de la RNA polimerasa II. Como subunidad del SL1 o TFIIIB, el TBP promueve la unión de RNA polimerasas I y III, respectivamente. Los promotores de la polimerasa I y III carecen de una caja TATA, al igual que muchos promotores de polimerasa II, aunque todas estas regiones del DNA enlazan el TBP.




*a*) *b*)

**FIGURA 11-17 Modelos estructurales de la formación del complejo de preinicio.** *a*) Modelo del complejo formado por DNA y tres de los GTF; TBP de TFIID, TFIIA y TFIIB. La interacción entre la caja TATA y el TBP dobla el DNA aproximadamente 80° y permite que el TFIIB se una al DNA, tanto corriente arriba como corriente abajo de la caja TATA. *b*) Vista superior e inferior de un modelo del complejo de preinicio. A diferencia del modelo esquemático de la figura 11-16*b*), se cree que el DNA (que se muestra en blanco) rodea al complejo de preinicio, para que los GTF puedan entrar en contacto con el DNA a ambos lados del sitio de inicio de la transcripción.

FUENTE: *a*) Gourisankar Ghosh y Gregory D. van Duyne, *Estructura* 1996;4:891, fig. 2, con permiso de Elsevier; *b*) M. Douziech, *et al. Mol Cell Biol* 2000;20:8175, fig. 7a. Cortesía de Benoit Coulombe. Reproducido con permiso de la American Society for Microbiology.

cuatro proteínas quinasas diferentes pueden catalizar la fosforilación de CTD, incluyendo la TFIIH, que fosforila las reservas de serina en la posición #5. La fosforilación de la polimerasa por la TFIIH puede actuar como el activador que desacopla la enzima de los GTF y/o el DNA del promotor, lo que permite que la enzima escape del complejo de preinicio y mueva hacia abajo la plantilla de DNA. En las etapas más tempranas de la transcripción, el CTD se fosforila en las posiciones Ser5, que proporcionan sitios de unión para las proteínas implicadas en las primeras etapas del procesamiento del mRNA, como la formación de la tapa 5′ (véase figura 11-32). A medida que la RNA polimerasa se mueve a lo largo del gen que se transcribe, otra quinasa (P-TEFb) fosforila el CTD en los restos de serina en la posición #2 (como en la figura 11-32).

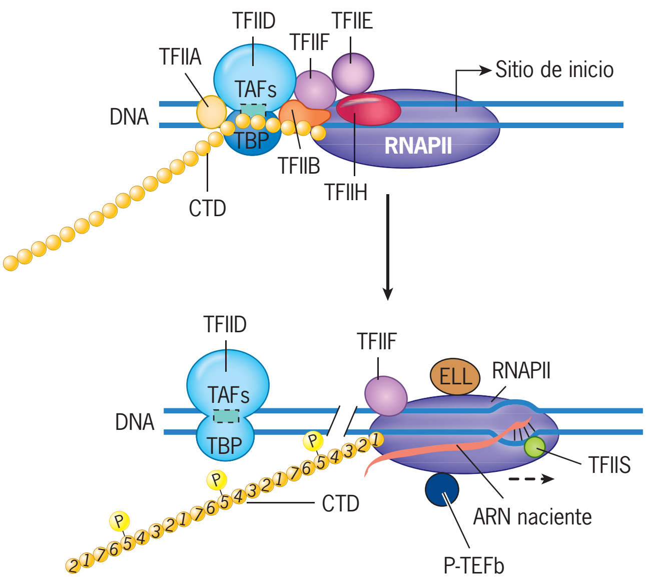



**FIGURA 11-18 El inicio de la transcripción por la ARN polimerasa II está asociado con la fosforilación del dominio C-terminal (*CTD, C-terminal domain*).** El inicio de la transcripción está asociado con la fosforilación catalizada por TFIIH de los residuos de serina en la posición 5 de cada repetición de la heptada del CTD. Se cree que la fosforilación proporciona el desencadenante para la separación de la maquinaria transcripcional de los factores de transcripción generales y/o el ADN promotor. TFIIS, ELL y P-TEFb son tres de los diversos factores de elongación que pueden asociarse con la polimerasa a medida que se mueve a lo largo del ADN. TFIIS ayuda a que la polimerasa vuelva a moverse después de que se detenga, mientras que P-TEFb es una quinasa que fosforila los residuos de Ser2 del CTD una vez que comienza la elongación. Se cree que la fosforilación de los residuos de Ser2 promueve el reclutamiento de factores de empalme de ARN y poliadenilación, cuyas actividades se analizan en las siguientes secciones (véase figura 11-32).

Se cree que este cambio en el patrón de fosforilación facilita el reclutamiento de factores proteicos adicionales implicados en el corte y empalme del RNA y la adición de una cola de poli(A), como se describe a continuación. De esta forma el CTD actúa como una plataforma para la ganancia dinámica y la pérdida de factores requeridos para la formación de un mRNA maduro. De acuerdo con algunas estimaciones, una RNA polimerasa II elongada puede contener más de 50 componentes y constituir una masa total de más de 3 millones de daltons.

El término de la transcripción por la RNA polimerasa II no se conoce bien. No hay evidencia de que el DNA de los genes que codifican proteínas contenga secuencias de terminación bien definidas, como ocurre en las células bacterianas. De hecho, una RNA polimerasa II que transcribe puede recorrer una distancia variable y extensa más allá del punto que finalmente dará lugar al extremo 3′ del mRNA procesado. Por tanto, a diferencia de las bacterias, donde el extremo 3′ del mRNA se genera simplemente por terminación de la transcripción, la formación del extremo 3′ de un mRNA eucariótico se determina mediante una serie separada de etapas de procesamiento (página 423).

Juntos, la RNA polimerasa II y sus GTF son suficientes para promover un bajo nivel de transcripción basal de la mayoría de los promotores bajo condiciones *in vitro*. Como se discutirá extensamente en el capítulo 12, una variedad de factores de transcripción específicos se pueden unir a numerosos sitios en las regiones reguladoras del DNA. Estos factores de transcripción específicos pueden determinar 1) si un complejo de preinicio se ensambla en un promotor particular y/o 2) la velocidad a la que la polimerasa inicia nuevas rondas de transcripción a partir de ese promotor. Antes de discutir la vía por la cual se producen los mRNA describamos primero la estructura de los mRNA, de modo que sean claras las razones para algunos de los pasos del procesamiento.

## Estructura de los mRNA

Los RNA mensajeros comparten ciertas propiedades:

1. Contienen una secuencia continua de nucleótidos que codifica un polipéptido específico.
2. Se encuentran en el citoplasma.
3. Cuando se transcriben están unidos a ribosomas.
4. La mayoría de los mRNA contienen un segmento significativo que no codifica, es decir, una porción que no dirige el ensamblaje de aminoácidos. Por ejemplo, aproximadamente 25% de cada mRNA de globina consiste en regiones no codificadas, no trasladadas (consúltese **FIGURA 11-19**). Las porciones no codificantes se encuentran en los extremos 5′ y 3′ de un RNA mensajero, y contienen secuencias que tienen funciones reguladoras importantes (consúltese sección 12.19).

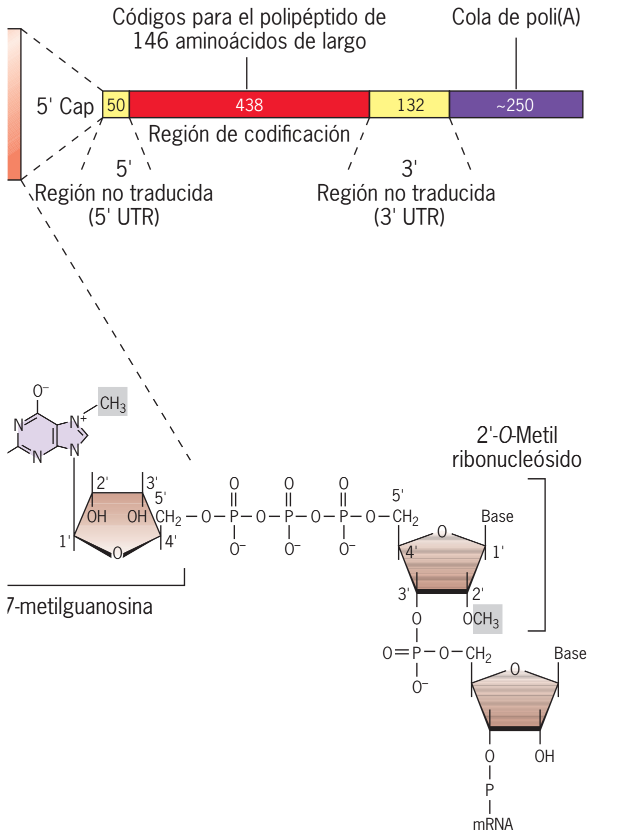



**FIGURA 11-19 Estructura del mRNA de β-globina humana.** El mRNA contiene una tapa de metilguanosina 5′, una región no codificante de 5′ y 3′ que flanquea el segmento de codificación, y una cola de poli(A) 3′. Las longitudes de cada segmento se dan en números de nucleótidos. La longitud de la cola poli(A) es variable. Por lo general comienza en una longitud de aproximadamente 250 nucleótidos y se reduce de modo gradual, como se muestra en la figura 12-62. Se muestra la estructura de la tapa 5′.

**16.** Los mRNA eucariotas tienen modificaciones especiales en sus extremos 5′ y 3′ que no se encuentran en los mRNA bacterianos, ni en el tRNA ni el rRNA. El extremo 3′ de casi todos los mRNA eucariotas tiene una hebra de 50 a 250 residuos de adenosina que forman una cola de poli(A), mientras que el extremo 5′ tiene una tapa de guanosina metilada (obsérvese figura 11-19).

Volveremos en breve para describir cómo adquieren los mRNA sus terminales especializados 5′ y 3′. No obstante, en primer lugar es necesario tomar un breve desvío para comprender cómo se forman los mRNA en la célula.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la relación entre los hnRNA y mRNA? ¿Cómo se descubrió esta relación?

## 11.6 Genes divididos: un hallazgo inesperado

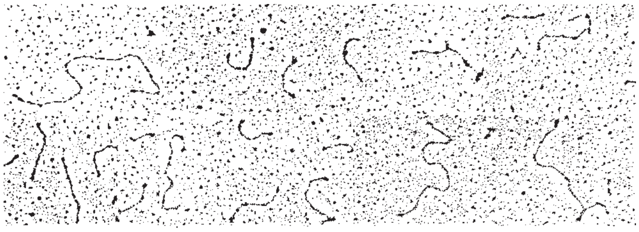
Casi tan pronto como se descubrieron los hnRNA se propuso que este grupo de RNA nucleares rápidamente marcados eran los precursores de los mRNA citoplásmicos (página 417). El principal punto de fricción fue la diferencia de tamaño entre las dos poblaciones de RNA: los hnRNA eran varias veces más grandes que los mRNA (consúltese **FIGURA 11-20**). ¿Por qué las células habrían de sintetizar moléculas enormes como precursoras de versiones mucho más pequeñas? Los primeros estudios sobre el procesamiento del RNA ribosómico habían demostrado que los RNA maduros se crearon a partir de precursores más grandes. Recordemos que se eliminaron segmentos grandes de los lados 5′ y 3′ de varios intermediarios del rRNA (consúltese figura 11-12) para producir los productos rRNA finales maduros. Se pensó que una ruta similar podría explicar el procesamiento de hnRNA a mRNA. Pero los mRNA constituyen una población tan diversa que era imposible seguir los pasos en el procesamiento de una única especie de mRNA, como se había intentado para los rRNA. El problema fue resuelto por un descubrimiento inesperado.

Hasta 1977, los biólogos moleculares supusieron que una secuencia lineal continua de nucleótidos en un RNA mensajero es complementaria a una secuencia continua de nucleótidos en una hebra del DNA de un gen. Más tarde en ese año, Phillip Sharp, Susan Berget y sus colegas del MIT, y Richard Roberts, Louise Chow y sus colegas de Cold Spring Harbor Laboratories en Nueva York, hicieron un descubrimiento notable. Estos grupos encontraron que los mRNA que estaban estudiando se transcribieron a partir de segmentos de DNA que estaban separados unos de otros a lo largo de la hebra plantilla.

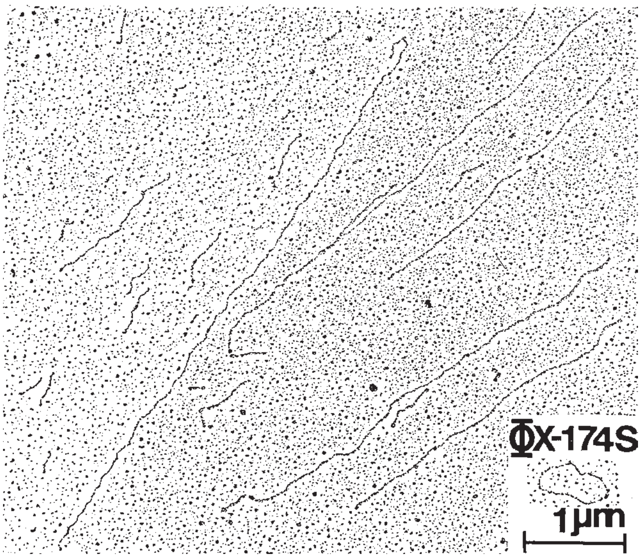
Las primeras observaciones de gran importancia se realizaron durante el análisis de la transcripción del genoma del adenovirus. El adenovirus es un patógeno capaz de infectar una variedad de células de mamíferos. Se descubrió que varios mRNA de adenovirus diferentes tenían el mismo extremo 5′ de 150 a 200 nucleótidos. Se podría esperar que esta secuencia líder represente un tramo repetido de nucleótidos, localizados cerca de la región promotora de cada uno de los genes para estos mRNA. Sin embargo, el análisis adicional reveló que la secuencia líder 5′ no es complementaria a una secuencia repetida, y además ni siquiera es complementaria a un tramo continuo de nucleótidos en el DNA plantilla. En cambio, la líder se transcribe a partir de tres segmentos distintos y separados de DNA (representados por los bloques x, y, z, en la línea superior de la **FIGURA 11-21**). Las regiones de DNA entre estos bloques, denominadas **secuencias intermedias** ($I_1$ a $I_3$ en figura 11-21), de alguna manera faltan en el mRNA correspondiente. Se podría haber argumentado que la presencia de secuencias intermedias es una peculiaridad de los genomas virales, pero la observación básica pronto se extendió a los genes celulares mismos.

La presencia de secuencias intermedias en genes celulares no virales se informó por primera vez en 1977 por Alec Jeffreys y Richard Flavell en Países Bajos y Pierre Chambon en Francia. Jeffreys y Flavell descubrieron una secuencia intermedia de aproximadamente 600 bases, localizadas en forma directa dentro de una parte del gen de globina, que codificaba la secuencia de aminoácidos del polipéptido de globina (obsérvese **FIGURA 11-22**). La base de este hallazgo se analiza en la leyenda que acompaña a la figura. Las secuencias intermedias pronto se encontraron en otros genes, y se hizo evidente que la presencia de genes con secuencias intermedias —llamados **genes divididos**— es la regla, no la excepción. Las partes de un gen dividido que contribuyen al producto de RNA maduro se llaman **exones**, mientras que las secuencias intermedias se llaman **intrones**. Los genes divididos están muy extendidos entre las eucariotas, aunque los intrones de eucariotas más simples (p. ej., levadura y nemátodos) tienden a ser menos numerosos y de menor tamaño que los de plantas y animales más complejos. Los intrones se encuentran en todos los tipos de genes, incluidos los que codifican los tRNA, rRNA, así como los mRNA.

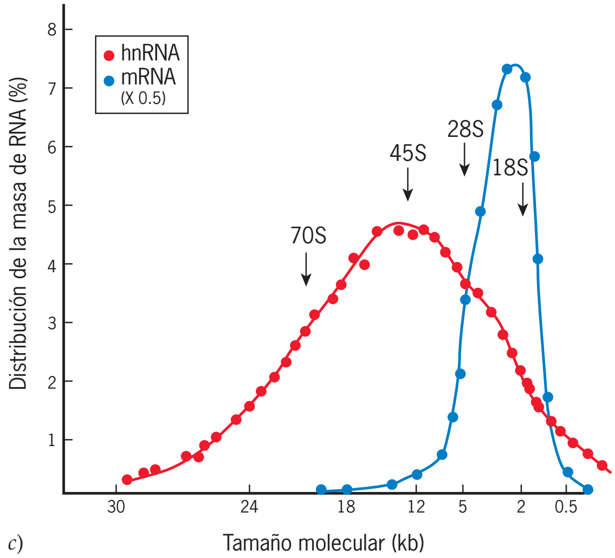
El descubrimiento de genes con intrones planteó de inmediato la cuestión de cómo dichos genes podían producir RNA mensajeros que carecen de estas secuencias. Una posibilidad era que las células produjeran una transcripción primaria que corresponda a la unidad de transcripción completa, y que las partes del RNA correspondientes a los intrones en el DNA se eliminen de alguna manera. Si este fuera el caso, entonces los segmentos correspondientes a los intrones deberían estar presentes en la transcripción primaria. Tal explicación también proporcionaría una



*a*)




*b*)




*c*)

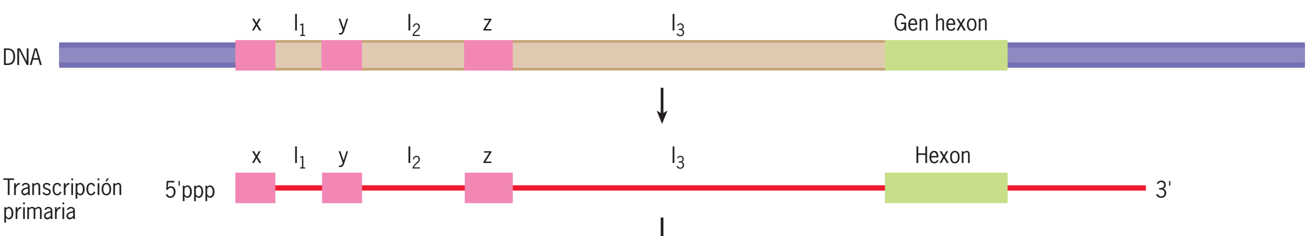
**FIGURA 11-20 Diferencia de tamaño entre hnRNA y mRNA.** *a-b*) Micrografías electrónicas de preparaciones sombreadas con metal de moléculas de poli(A)-mRNA *a*) y poli(A)-hnRNA *b*). Se muestran clases de tamaño representativas de cada tipo. La molécula de referencia es el DNA viral -X-174. c) Distribución de tamaños de hnRNA y mRNA de células L de ratón, tal como se determina por sedimentación en gradiente de densidad. La línea roja representa el hnRNA marcado rápidamente, mientras que la línea azul representa el mRNA que se aisló de los polirribosomas después de un periodo de marcaje de 4 horas. La abscisa se ha convertido del número de fracción (indicado por los puntos) al tamaño molecular mediante la calibración de los gradientes.

FUENTE: *a-b*) John A. Bantle y William E. Hahn, *Cell* 1976;8:145,. Reproducido con permiso de Elsevier.

razón por la cual las moléculas de hnRNA son mucho más grandes que las moléculas de mRNA que finalmente producen.

Ya en este momento la investigación sobre el RNA nuclear había avanzado hasta determinar el tamaño de unos pocos precursores de mRNA **(pre-mRNA)**. Por ejemplo, la secuencia de globina se encontró presente en una molécula de RNA nuclear que sedimenta a 15S, a diferencia del mRNA de la globina final, que tiene un coeficiente de sedimentación de 10S. Shirley Tilghman, Philip Leder y sus colaboradores de los National Institutes of Health emplearon una ingeniosa técnica (conocida como formación de lazo R) para determinar la relación física entre los RNA de globina 15S y 10S y proporcionar información sobre la transcripción de genes divididos.

Recordemos a partir de la página 384 que las hebras simples de DNA complementarias se pueden unir específicamente entre sí. Las moléculas de DNA y RNA de hebra simple también se pueden unir entre sí, siempre que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias; esta es la base de la tecnología de la hibridación DNA-RNA discutida en la sección 18.18 (el complejo DNA-RNA se denomina *híbrido*). Tilghman y sus colaboradores utilizaron el microscopio electrónico para examinar un fragmento de DNA que contiene el gen de la globina que se hibridizó con el RNA de la globina 15S. Se observó que el híbrido consistía en un complejo de DNA-RNA continuo de doble hebra (las líneas punteadas y azules del recuadro de la **FIGURA 11-23*a***). Por el contrario, cuando el mismo fragmento de DNA se incubó con el 10s



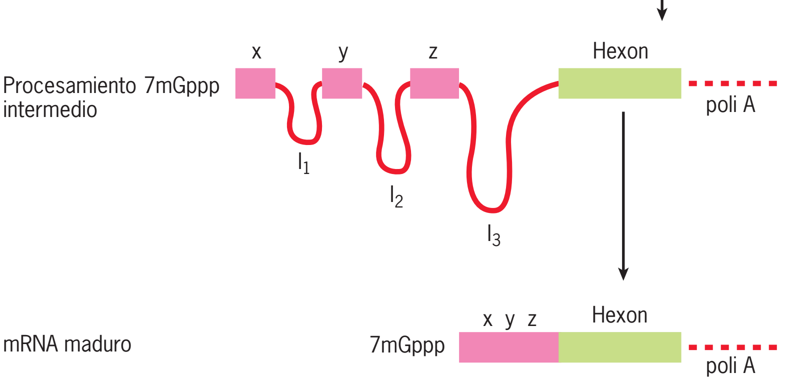
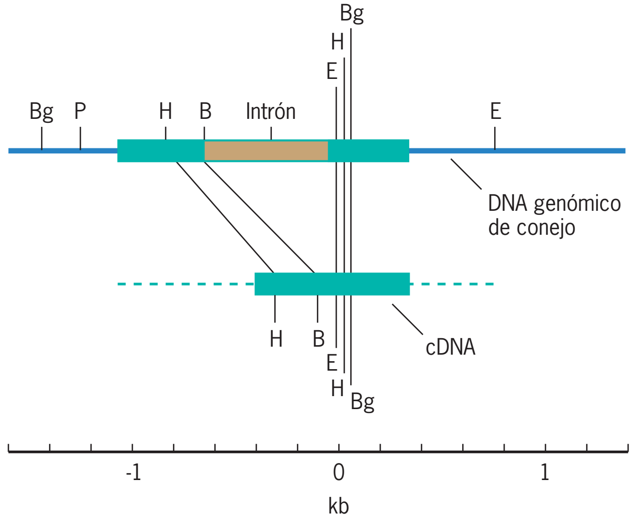




**FIGURA 11-21 Descubrimiento de secuencias intermedias (intrones).** Una porción del genoma de adenovirus se muestra en la parte superior. Los bloques de secuencias no continuas marcados x, y, z aparecen en una disposición continua en los mRNA maduros que codifican una variedad de polipéptidos, tales como la proteína hexon. Como se discutirá más adelante en el texto, la conversión del transcripto primario al mRNA implica la eliminación (división) de las secuencias intermedias o intrones ($I_1$ a $I_3$), y la ligadura de las porciones restantes para producir una molécula de RNA continua (abajo). Los pasos por los cuales ocurre esto se muestran en la figura 11-30.

**FIGURA 11-22 Descubrimiento de intrones en un gen eucariótico.** Como se discute en el capítulo 18, las bacterias contienen enzimas de restricción que reconocen y fraccionan moléculas de DNA en el sitio de ciertas secuencias de nucleótidos. El dibujo muestra un mapa de sitios de división de enzimas de restricción en la región del gen de β-globina de conejo (superior) y el mapa correspondiente de un cDNA preparado a partir del mRNA de β-globina (inferior). (Un cDNA es un DNA hecho *in vitro* por transcriptasa inversa utilizando el mRNA como plantilla. Por tanto, el cDNA tiene la secuencia complementaria del mRNA. Fue necesario usar los cDNA para este experimento porque las enzimas de restricción no dividen el RNA). Las letras indican los sitios en los que diversas enzimas de restricción rompen los dos DNA. El mapa superior muestra que el gen de globina contiene un sitio de restricción para la enzima BamH1 (B) localizada aproximadamente a 700 pares de bases de un sitio de restricción para la enzima EcoR1 (E). Cuando el cDNA de globina se trató con estas mismas enzimas (mapa inferior), los sitios B y E correspondientes se localizaron tan sólo 67 nucleótidos. Es evidente que el DNA preparado a partir del genoma tiene una región considerable que está ausente del cDNA correspondiente (y por tanto ausente del mRNA a partir del cual se produjo el cDNA). La secuenciación completa del gen de globina mostró más tarde que contiene un segundo intrón más pequeño.

FUENTE: AJ Jeffreys y RA Flavell, *Cell* 1977;12:1108; con el permiso de Cell Press.





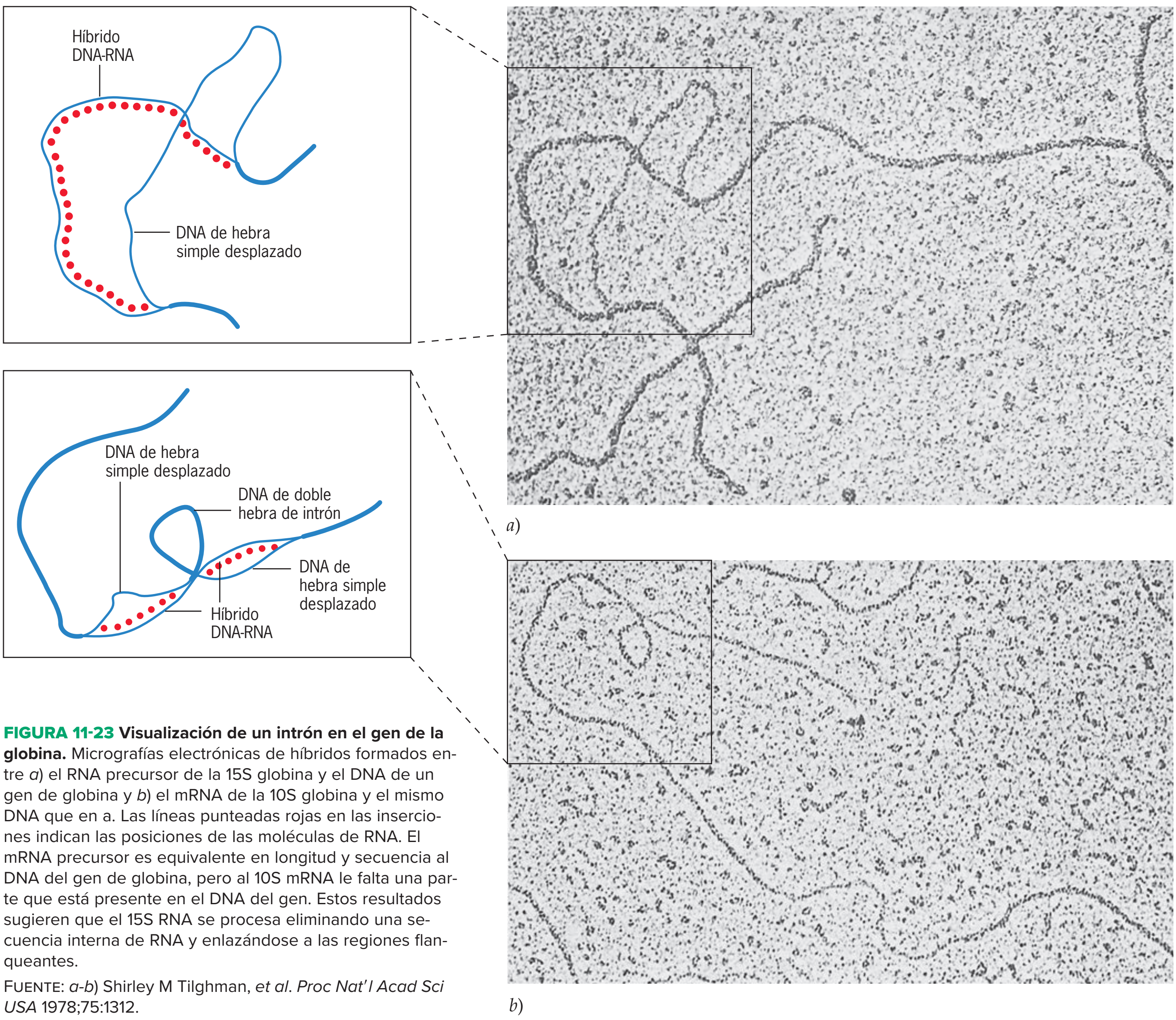




**FIGURA 11-23 Visualización de un intrón en el gen de la globina.** Micrografías electrónicas de híbridos formados entre *a*) el RNA precursor de la 15S globina y el DNA de un gen de globina y *b*) el mRNA de la 10S globina y el mismo DNA que en a. Las líneas punteadas rojas en las inserciones indican las posiciones de las moléculas de RNA. El mRNA precursor es equivalente en longitud y secuencia al DNA del gen de globina, pero al 10S mRNA le falta una parte que está presente en el DNA del gen. Estos resultados sugieren que el 15S RNA se procesa eliminando una secuencia interna de RNA y enlazándose a las regiones flanqueantes.

FUENTE: *a*-*b*) Shirley M Tilghman, *et al*. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1978;75:1312.

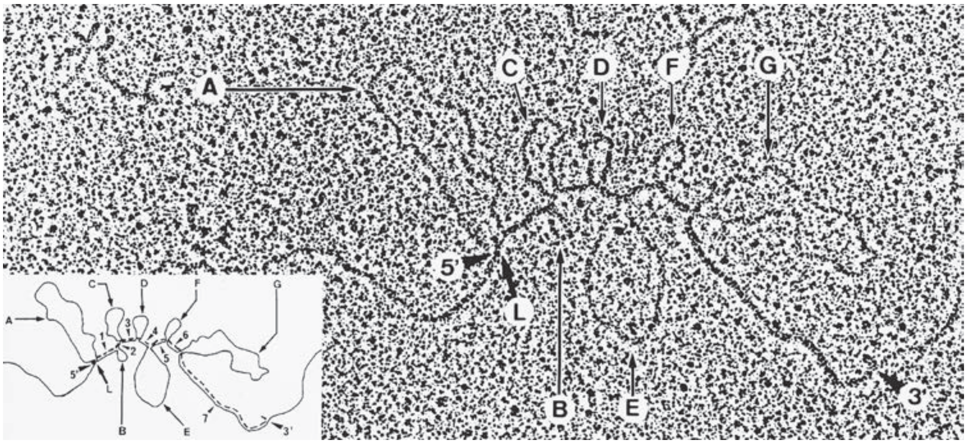



**FIGURA 11-24 Visualización de intrones en el gen de la ovoalbúmina.** Micrografía electrónica de un híbrido formado entre el mRNA de la ovoalbúmina y un fragmento de DNA de pollo genómico que contiene el gen de la ovoalbúmina. El híbrido que se muestra en esta micrografía es similar en naturaleza al de la figura 11-23*b*). En ambos casos el DNA contiene la secuencia del gen completo, porque se aisló directamente del genoma. Por el contrario, el RNA se ha procesado por completo y se han eliminado las partes que se transcribieron a partir de los intrones. Cuando el DNA genómico y el mRNA se hibridan, las porciones del DNA que no están representadas en el mRNA se desechan como lazos. Se pueden distinguir los lazos de los siete intrones (A-G).
FUENTE: Cortesía de Pierre Chambon.

mRNA de globina maduro, se observó que un gran segmento del DNA en el centro de la región codificante se abultó para formar un lazo de doble hebra (véase figura 11-23*b*). El lazo fue el resultado de un gran intrón en el DNA que no era complementario a ninguna parte del mensaje más pequeño de la globina. Resultó evidente que el 15S RNA ciertamente contiene segmentos correspondientes a los intrones de los genes que se eliminan durante la formación del 10S mRNA.

Aproximadamente al mismo tiempo se realizó un tipo similar de experimento de hibridación entre el DNA que codifica la ovoalbúmina, una proteína que se encuentra en los huevos de gallina, y su correspondiente mRNA. El DNA de ovoalbúmina y el mRNA híbrido contienen siete lazos distintos que responden a siete intrones (obsérvese **FIGURA 11-24**). Tomados en conjunto, los intrones representan aproximadamente tres veces más DNA que el presente en las ocho porciones de codificación combinadas (exones). Estudios posteriores han revelado que los exones individuales promedian alrededor de 165 nucleótidos. En contraste, los intrones individuales promedian más de 3 500 nucleótidos, por lo que las moléculas de hnRNA son mucho más largas que las mRNA. Para citar dos casos extremos, el gen de la distrofina humana se extiende por aproximadamente 100 veces la longitud necesaria para codificar su mensaje correspondiente, y el gen de colágeno tipo I contiene más de 50 intrones. El gen humano promedio contiene aproximadamente nueve intrones que constituyen más de 95% de la unidad de transcripción.

Estos y otros hallazgos proporcionaron una fuerte evidencia a favor de la proposición de que la formación de mRNA en las células eucariotas ocurre por la eliminación de secuencias inteRNA de ribonucleótidos de un pre-mRNA mucho mayor. Regresemos a los pasos a través de los cuales ocurre esto.

**REPASO**

1. ¿Qué es un intrón? ¿Cómo se descubrió la existencia de intrones y exones?

## 11.7 Procesamiento de los RNA mensajeros eucarióticos

La RNA polimerasa II ensambla una transcripción primaria que es complementaria al DNA de la unidad de transcripción completa. El examen en el microscopio electrónico de genes transcripcionalmente activos indica que las transcripciones de RNA se asocian con proteínas y partículas de mayor tamaño mientras aún están en proceso de síntesis (véase **FIGURA 11-25**). Estas partículas, que consisten en proteínas y ribonucleoproteínas, incluyen los agentes responsables de convertir el transcripto primario en un mensajero maduro. Este proceso de conversión requiere la adición de una tapa 5′ y una cola 3′ poli(A) a los extremos del transcripto, y la eliminación de cualquier intrón intermedio. Una vez que se completa el procesamiento, el mRNP —que consiste en el mRNA y las proteínas asociadas— está listo para la exportación desde el núcleo.

### Tapas 5′ y colas de 3′ poli(A)

Los extremos 5′ de todos los RNA poseen inicialmente un trifosfato, derivado del primer nucleósido trifosfato incorporado en el sitio de inicio de la síntesis del RNA. Una vez que el extremo 5′ de un precursor de mRNA se ha sintetizado, varias actividades enzimáticas actúan sobre este extremo de la molécula (obsérvese **FIGURA 11-26**). En el primer paso, se elimina el último de los tres fosfatos y se convierte el extremo 5′ en un difosfato (paso 1, véase figura 11-26). Luego, se agrega un GMP en una orientación *invertida* de modo que el extremo 5′ de la guanosina se encuentre frente al extremo 5′ de la hebra de RNA (paso 2, obsérvese figura 11-26). Como resultado, los dos primeros nucleósidos están unidos por un inusual puente 5′-5′ trifosfato. Finalmente, la guanosina invertida terminal está metilada en la posición 7 en su base de guanina, mientras que el nucleótido en el lado interno del puente trifosfato está metilado en la posición 2′ de la ribosa (paso 3, consúltese figura 11-26). El extremo 5′ del RNA ahora contiene una **tapa de metilguanosina** (que se muestra con mayor detalle en la figura 11-19). Estas modificaciones enzimáticas en el extremo 5′ de la transcripción primaria ocurren muy rápidamente, mientras la molécula de RNA aún se encuentra en sus primeras etapas de síntesis. De hecho, las enzimas que tapan son reclutadas por el CTD fosforilado de la polimerasa (véase figura 11-32). La tapa de metilguanosina en el extremo 5′ de un mRNA cumple varias funciones: evita que el extremo 5′ del mRNA sea digerido por las exonucleasas, ayuda a transportar el mRNA fuera del núcleo, y desempeña un papel importante en el inicio de la traducción de mRNA.

Como se indicó anteriormente, el extremo 3′ de un mRNA contiene una hebra de residuos de adenosina que forma una **cola de poli(A)**. A medida que se secuenciaron varios mRNA, se hizo evidente que la cola de poli(A) comienza usualmente de 10 a 30 nucleótidos corriente abajo de la secuencia AAUAAA. Esta se-

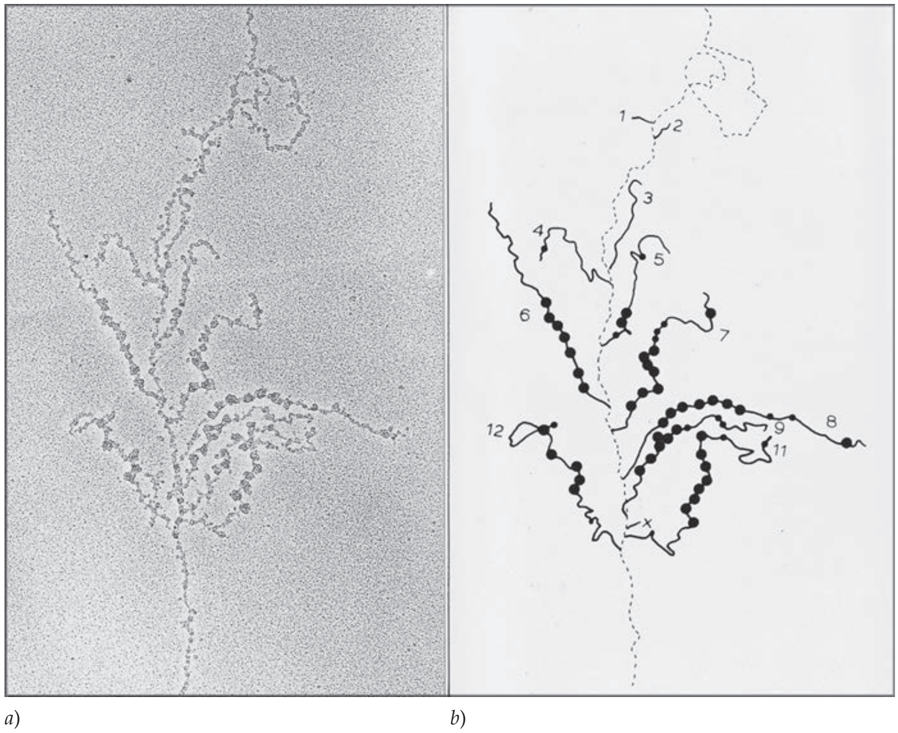



**FIGURA 11-25 Los transcriptos de pre-mRNA se procesan a medida que se sintetizan (es decir, cotranscripcionalmente).** *a*) Micrografía electrónica de una unidad de transcripción no ribosomal que muestra la presencia de partículas de ribonucleoproteína unidas a las transcripciones nacientes de RNA. *b*) Rastreo interpretativo de la micrografía mostrada en la parte a. La línea de puntos representa la hebra de cromatina (DNA), las líneas continuas representan fibrillas de ribonucleoproteína (RNP), y los círculos sólidos representan partículas de RNP asociadas a las fibrillas. Las transcripciones individuales están numeradas, comenzando con el 1, que está más cerca del punto de inicio. Las partículas RNP no se distribuyen aleatoriamente a lo largo del transcripto naciente, sino que están unidas a sitios específicos donde se está llevando a cabo el procesamiento del RNA.

FUENTE: Ann L. Beyer, Oscar L. Miller, Jr. y Steven L. Mcknigh. *Cell* 1980;20:78, reproducida con permiso de Elsevier.

cuencia en el transcripto primario sirve como un sitio de reconocimiento para el ensamblaje de un gran complejo de proteínas que llevan a cabo las reacciones de procesamiento en el extremo 3′ del mRNA (consúltese figura 11-26). El complejo de procesamiento de poli(A) también está físicamente asociado con la CTD fosforilada de la RNA polimerasa II, ya que sintetiza la transcripción primaria (véase figura 11-32).

Entre las proteínas del complejo de procesamiento se incluye una endonucleasa (obsérvese figura 11-26, arriba) que divide el pre-mRNA corriente abajo a partir del sitio de reconocimiento. Después de la división por la nucleasa, una enzima llamada *poli(A) polimerasa* agrega aproximadamente 250 adenosinas sin la necesidad de una plantilla (pasos *a-c*, véase figura 11-26). Como se discutió en la sección 12.6, la cola de poli(A) junto con una proteína asociada protege al mRNA de la degradación prematura por las exonucleasas. Es importante observar que muchos genes poseen más de una secuencia de reconocimiento de poli(A) en sus segmentos 3′ no codificantes. Estos genes se pueden transcribir a un mRNA cuyo segmento 3′ no codificante (3′ UTR) tiene diferentes longitudes, y por tanto puede estar sujeto a diferentes influencias reguladoras.

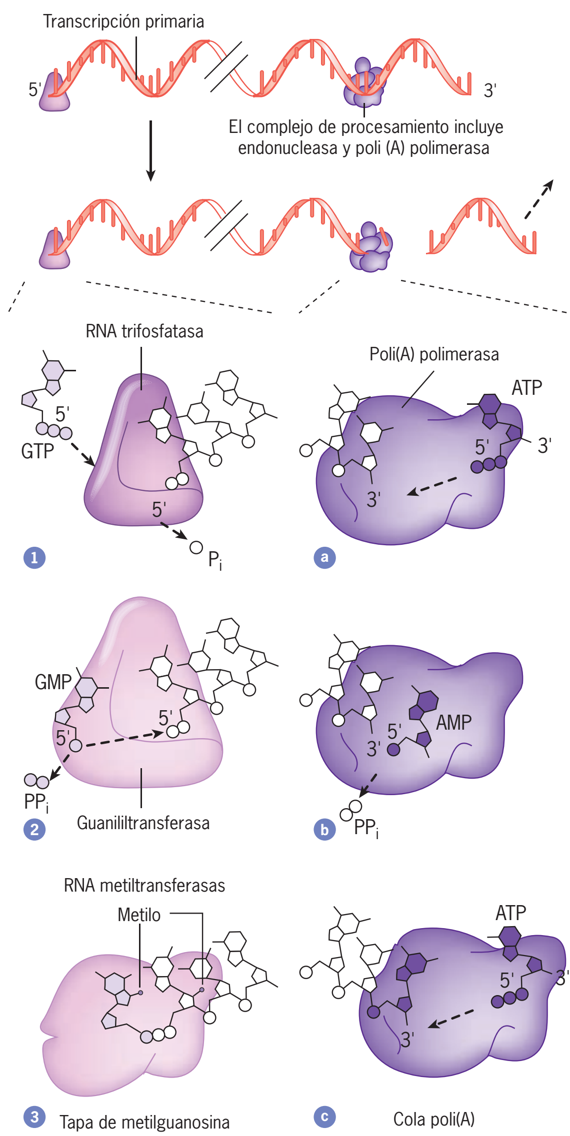



**FIGURA 11-26 Pasos en la adición de una tapa de metilguanosina 5′ y una cola de poli(A) 3′ a un pre-mRNA.** El extremo 5′ del pre-mRNA naciente se une a una enzima-tapa, que en los mamíferos tiene dos sitios activos que catalizan diferentes reacciones: una trifosfatasa que elimina el grupo terminal de fosfato (paso 1) y una guaniltransferasa que agrega un residuo de guanina en una orientación inversa, por medio de un enlace de 5′-a-5′ (paso 2). En el paso 3 las diferentes metiltransferasas añaden un grupo metilo a la tapa terminal de guanosina, y a la ribosa del nucleótido que había estado al final del RNA naciente. Un complejo de proteína (llamado CBC) se une a la tapa completa (no se muestra). Una serie muy diferente de eventos ocurre en el extremo 3′ del pre-mRNA, donde se ensambla un gran complejo proteico. Primero, una endonucleasa escinde el transcripto de RNA primario, lo que genera un nuevo extremo 3′ corriente arriba del extremo 3′ original. En los pasos *a-c* la poli(A) polimerasa añade residuos de adenosina al extremo 3′ sin la participación de una plantilla de DNA. Un mRNA típico de mamífero contiene de 200 a 250 residuos de adenosina en su cola completa de poli(A); el número es considerablemente menor en las eucariotas inferiores.

FUENTE: Tras DA Micklos y GA Freyer, *DNA Science*, Carolina Biological Supply Co.

## Empalme del RNA: eliminación de intrones de un RNA previo

Los pasos clave en el procesamiento de un pre-mRNA se muestran en la **FIGURA 11-27**. Además de la formación de la tapa 5′ y la cola poli(A) ya discutidas, las partes de una secuencia de comandos primaria que corresponden a las secuencias de DNA intermedias (los intrones) se deben eliminar mediante un proceso complejo conocido como **empalme RNA**. Para empalmar un RNA se deben introducir rupturas en el filamento en los extremos 5′ y 3′ (los **sitios de empalme**) de cada intrón, y los exones situados a cada lado de los sitios de corte y empalme se deben enlazar de forma covalente (ligarse). Es imperativo que el proceso de corte y empalme ocurra con una precisión absoluta, porque la adición o la pérdida de un único nucleótido en cualquiera de las uniones de empalme causará que el mRNA resultante se traduzca mal.

¿Cómo la misma maquinaria de empalme básico reconoce los límites exón-intrón en miles de pre-mRNA diferentes? El examen de cientos de uniones entre exones e intrones, en eucariotas que van desde levaduras hasta insectos y mamíferos, reveló la presencia en los sitios de corte y empalme de una secuencia de nucleótidos conservada de origen evolutivo antiguo. En la **FIGURA 11-28** se muestra la secuencia más común encontrada en los bordes exón-intrón dentro de las moléculas de pre-mRNA de mamífero. El G/GU en el extremo 5′ del intrón (*el sitio de empalme 5′*), el AG/G en el extremo 3′ del intrón (*el sitio de empalme 3′*) y el *tracto de polipirimidina* cerca del sitio de empalme 3′ están presentes en la vasta mayoría de los pre-mRNA eucarióticos.[4] Además, las regiones adyacentes del intrón contienen nucleótidos preferenciales —como se indica en la figura 11-28— que desempeñan un papel importante en el reconocimiento del sitio de corte y empalme. Las secuencias representadas en la figura 11-28 son necesarias para el reconocimiento del sitio de empalme, pero no son suficientes. Los intrones normalmente se ejecutan en miles de nucleótidos, y a menudo contienen segmentos internos que coinciden con la secuencia de consenso que se muestra en la figura 11-28 —pero la célula no los reconoce como señales de corte y empalme, y en consecuencia los ignora. Secuencias específicas, sobre todo las *potenciadoras de empalmes exónicos*, o *ESEs*, situadas dentro de los exones (véase figura 11-30, recuadro A) proporcionan los indicios adicionales que permiten distinguir la maquinaria de empalme entre los exones y los intrones. Los cambios en la secuencia de DNA dentro de un sitio de corte y empalme, o una ESE, pueden conducir a la inclusión de un intrón o a la exclusión de un exón. Se estima que aproximadamente 15% de las enfermedades humanas heredadas se producen directamente a partir de mutaciones que alteran el empalme previo al mRNA. Además, gran parte de la variación genética "normal" en la susceptibilidad a enfermedades comunes presente en la población humana (página 400) puede ser el resultado de los efectos de esta variación en la eficiencia del corte y empalme del RNA.

La comprensión del mecanismo de corte y empalme de RNA ha surgido a través de una apreciación de las notables capacidades de las moléculas de RNA. La primera evidencia de que las moléculas de RNA fueron capaces de catalizar reacciones químicas fue obtenida en 1982 por Thomas Cech y sus colegas de la Universidad de Colorado. Como se discute de manera amplia en "Vías experimentales" (consúltese sección 11.20), estos investigadores encontraron que el protozoo ciliado *Tetrahymena* sintetizó un precursor de rRNA (un pre-rRNA) que fue capaz de empalmarse a sí mismo. Además de revelar la existencia de enzimas de RNA o ribozimas, estos experimentos cambiaron el pensamiento entre los biólogos acerca de las funciones relativas del RNA y la proteína en el mecanismo de corte y empalme del RNA.

El intrón en el pre-rRNA de *Tetrahymena* es un ejemplo de un *intrón del grupo I*, que no se discutirá. Otro tipo de intrón autoaplicable, llamado intrón del grupo II, se descubrió posteriormente en mitocondrias fúngicas, cloroplastos de plantas y una variedad

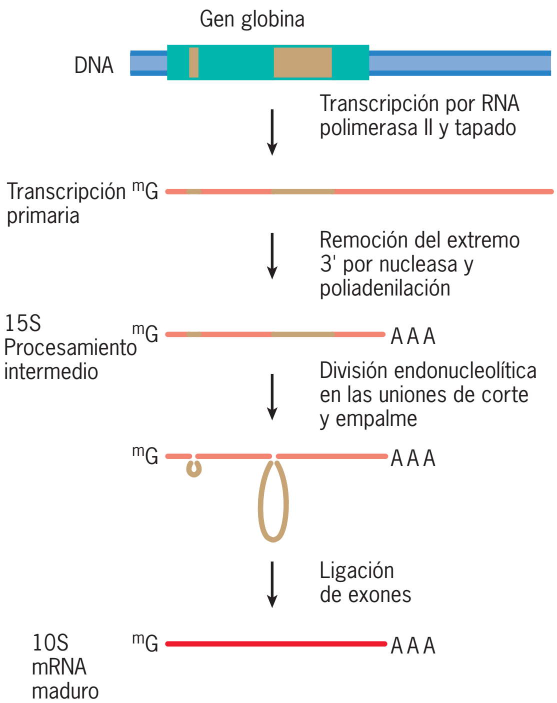



**FIGURA 11-27 Descripción general de los pasos durante el procesamiento del mRNA de la globina.** Los intrones se muestran en marrón, mientras que las porciones verdes del gen indican las posiciones de los exones; es decir, las secuencias de DNA que están representadas en el RNA mensajero maduro.

[4] Alrededor de 1% de los intrones tienen dinucleótidos AT y AC en sus extremos 5′ y 3′ (en lugar de GU y AG). Estos intrones AT/AC son procesados por un tipo diferente de espliceosoma, llamado espliceosoma U12, porque contiene un U1 snRNA2 en lugar del snRNA U2 del espliceosoma principal.

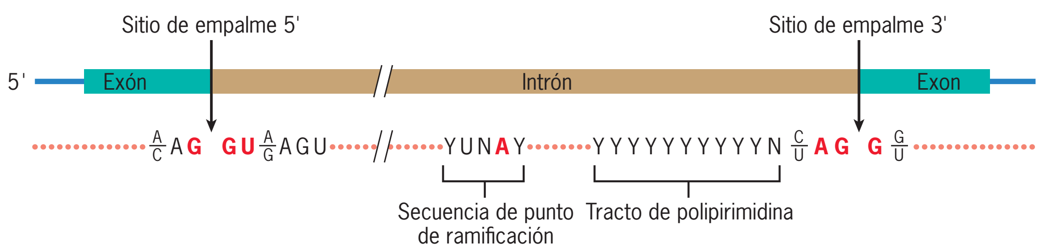



**FIGURA 11-28 Secuencias de nucleótidos en los sitios de corte y empalme de los pre-mRNA.** Además de codificar la información para construir un polipéptido, un pre-mRNA también debe contener información que dirija la maquinaria responsable del empalme de RNA. Las secuencias de nucleótidos mostradas en las regiones de los sitios de corte y empalme se basan en el análisis de un gran número de pre-mRNA, y por tanto se denominan secuencias consenso. Las bases que se muestran en rojo son prácticamente invariables; aquellas en negro representan la base preferida en esa posición; N representa cualquiera de los cuatro nucleótidos; Y representa una pirimidina. Es típico que el tracto de alimentación de polipirimida cerca del sitio de empalme 3′ contenga entre 10 y 20 pirimidinas. La secuencia de punto de ramificación que se muestra es la que se encuentra en los pre-mRNA humanos, y usualmente está a unas 30 bases corriente arriba del extremo 3′ del intrón.

de bacterias y arqueas. Los intrones del grupo II se pliegan en una estructura compleja diseñada bidimensionalmente en la **FIGURA 11-29*a***. Los intrones del grupo II se someten a un autoempalme al atravesar una etapa intermedia, llamada *lazo* (consúltese figura 11-29*b*), porque se asemeja al tipo de cuerda utilizada por los vaqueros para atrapar terneros desbocados. El primer paso en el corte y empalme del intrón del grupo II es la división del sitio de empalme 5′ (paso 1, véase figura 11-29*b*), seguido de la formación de un lazo por medio de un enlace covalente entre el extremo 5′ del intrón y una adenosina residuo cerca del extremo 3′ del intrón (paso 2). La posterior escisión del sitio de corte y empalme 3′ libera el lazo y permite que los extremos cortados del exón se enlacen en forma covalente (ligados) (paso 3).

Los pasos que ocurren durante la eliminación de los intrones de las moléculas de pre-mRNA en células eucariotas son bastante similares a los que siguen los intrones del grupo II. La principal diferencia es que el pre-mRNA no es capaz de empalmarse, lo que requiere en su lugar un anfitrión de gran cantidad de **RNA nucleares pequeños (snRNA)** y sus proteínas asociadas. A medida que se transcribe cada molécula de hnRNA grande, se asocia con una variedad de proteínas para formar una **ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP)**, que representa el sustrato para las reacciones de procesamiento que siguen. El procesamiento ocurre cuando cada intrón del pre-mRNA se asocia con una máquina macromolecular dinámica llamada **espliceosoma**. Cada espliceosoma consiste en una variedad de proteínas y varias partículas de ribonucleoproteínas diferentes, llamadas **ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP)** porque están compuestas de snRNA unidos a proteínas específicas. Los espliceosomas no están presentes dentro del núcleo en un estado prefabricado, sino que se ensamblan cuando sus componentes snRNP se unen al pre-mRNA. Una vez que se ensambla la maquinaria espliceosoma, los snRNP llevan a cabo las reacciones que cortan los intrones de la transcripción, y pegan los extremos de los exones. Los intrones extirpados, que constituyen más de 95% del pre-mRNA de mamífero promedio, simplemente se degradan dentro del núcleo.

Nuestra comprensión de los pasos en el corte y empalme del RNA se ha logrado en gran medida a través de estudios de extractos libres de células que pueden empalmar con precisión pre-mRNA *in vitro*. Algunos de los pasos principales en el ensamblaje de un empalme y la eliminación de un intrón se indican en la **FIGURA 11-30** y se describen con cierto detalle en la leyenda que se acompaña. Tomados en conjunto, la remoción de un intrón requiere varias partículas snRNP: el U1 snRNP, el U2 snRNP, el U5 snRNP y el U4/U6 snRNP, que contiene los snRNA U4 y U6 unidos. Además de su snRNA cada nRNP contiene una docena o más de proteínas. Una familia llamada *proteínas Sm*, está presente en todos los snRNP. Las Sm proteínas se enlazan entre sí y a un sitio conservado en cada snRNA (excepto el U6 snRNA) para formar el núcleo del snRNP. La **FIGURA 11-31*a*)** muestra un modelo estructural del U1 snRNP, con las ubicaciones de las proteínas snRNA, Sm y otras proteínas dentro de la partícula indicada. La figura 11-31*b*) muestra sólo el U1 nRNA. Las proteínas Sm se identificaron por primera vez porque son el blanco de los anticuerpos producidos por pacientes con la enfermedad autoinmune del lupus eritematoso sistémico. Las otras proteínas de los snRNP son únicas para cada partícula.

Los eventos descritos en la figura 11-30 proporcionan excelentes ejemplos de las interacciones complejas y dinámicas que pueden ocurrir entre las moléculas de RNA. Los reordenamientos múltiples entre las moléculas de RNA que se producen durante el ensamblaje de un espliceosoma están principalmente mediados por las helicasas de RNA que consumen ATP presentes en los nRNP. Las helicasas de RNA pueden desenrollar los RNA de doble hebra, como el dúplex U4-U6 que se muestra en la figura 11-30, recuadro B, que permite que los RNA desplazados se enlacen a nuevos asociados. También se cree que las helicasas espliceosomales retiran los RNA de las proteínas enlazadas, incluida

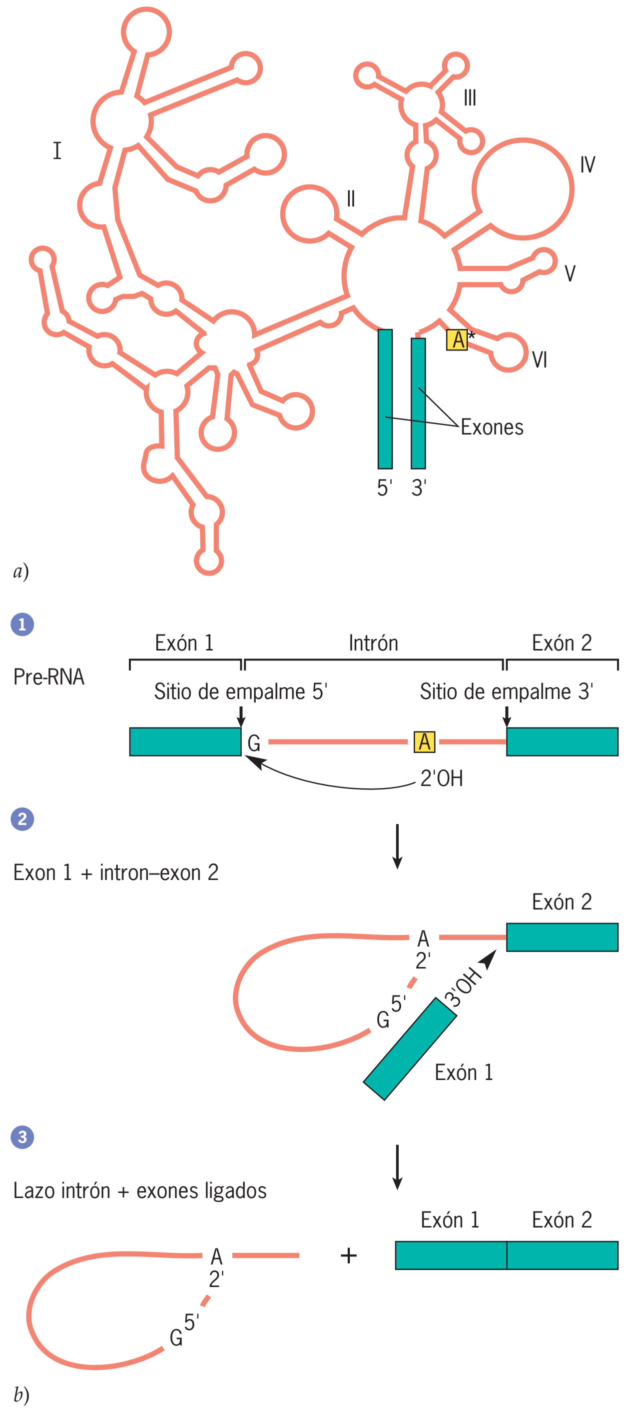



**FIGURA 11-29 Estructura y ruta de autofragmentación de los intrones del grupo II.** *a*) Estructura bidimensional de un intrón del grupo II (mostrado en rojo). El intrón se pliega en seis dominios característicos que se irradian desde una estructura central. El asterisco indica el nucleótido de adenosina que sobresale del dominio VI y forma la estructura de lazo, como se describe en el texto. Los dos extremos del intrón se dirigen de manera similar el uno hacia el otro, como lo indica la proximidad de los dos límites intrón-exón. *b*) Pasos en el autoempalme de intrones del grupo II. En el paso 1, el 2′OH de una adenosina dentro del intrón (asterisco en el dominio VI de la parte *a*) lleva a cabo un ataque nucleofílico en el sitio de empalme 5′, divide el RNA y forma un inusual enlace fosfodiester 2′-5′ con el primer nucleótido del intrón (paso 2). Esta estructura ramificada se describe como un lazo. También mostrado en el paso 2, el 3′OH libre del exón desplazado ataca el sitio de empalme 3′, que divide el RNA en el otro extremo del intrón. Como resultado de esta reacción, el intrón se libera como un lazo libre, y los extremos 3′ y 5′ de los dos exones flanqueantes se ligan (paso 3). Se sigue una ruta similar en el corte y empalme de intrones a partir de los pre-mRNA, pero en lugar de producirse por autoempalme, estos pasos requieren la ayuda de una serie de factores adicionales.

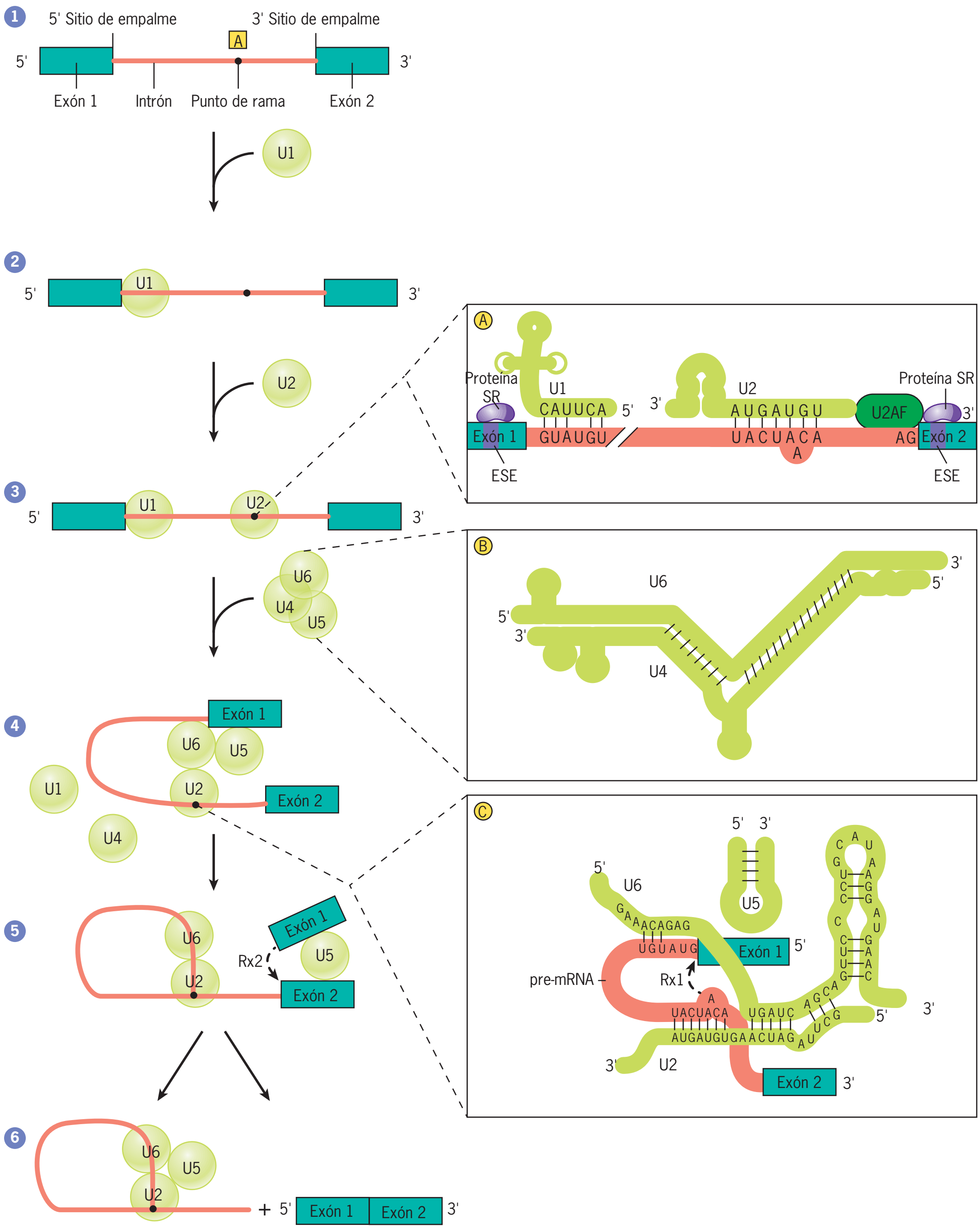



**FIGURA 11-30 Modelo esquemático del ensamblaje de la máquina de corte y empalme y algunos de los pasos que ocurren durante el empalme del pre-mRNA.** El paso 1 muestra la parte del pre-mRNA que se empalmará. En el paso 2, el primero de los componentes del empalme, el U1 snRNP, se ha unido al sitio de empalme 5′ del intrón. La secuencia de nucleótidos de U1 snRNA es complementaria al sitio de empalme 5′ del pre-mRNA, y la evidencia indica que el U1 snRNP se une inicialmente al lado 5′ del intrón mediante la formación de pares de bases específicos entre el sitio de corte y empalme y el U1 snRNA (véase recuadro A). El U2 snRNP está próximo a entrar en el complejo de corte y empalme, uniéndose al pre-mRNA (como se muestra en el recuadro A) de forma que causa que un residuo específico de adenosina (punto) sobresalga de la hélice circundante (paso 3). Este es el sitio que luego se convierte en el punto de ramificación del lazo. Se cree que el U2 es reclutado por la proteína U2AF, que se une al tracto de polipirimidina cerca del sitio de empalme 3′. El U2AF también interactúa con proteínas SR que se unen a los potenciadores exónicos de corte y empalme (ESE, *exonic splicing enhancers*). Estas interacciones juegan un papel importante en el reconocimiento de fronteras intrón/exón. El siguiente paso es la unión de los U4/U6 y U5 snRNP al pre-mRNA con el desplazamiento acompañante de U1 (paso 4). El ensamblaje de un espliceosoma implica una serie de interacciones dinámicas entre el pre-mRNA y los snRNA específicos y entre los snRNA mismos. A medida que ingresan en el complejo con el pre-mRNA, los U4 y U6 snRNA están emparejados entre sí de manera extensa (recuadro B). Posteriormente el U4 snRNA se extrae del dúplex, y las regiones de U6 que se emparejaron con el U4 se emparejan por bases con una porción del U2 snRNA (recuadro C). Otra porción del U6 snRNA está situada en el sitio de corte y empalme 5′ (recuadro C), habiendo desplazado al U1 snRNA que previamente estaba enlazado allí (recuadro A). Se ha propuesto que el U6 es una ribozima y que el U4 es un inhibidor de su actividad catalítica. De acuerdo con esta hipótesis, una vez que los U1 y U4 snRNA se han desplazado, el U6 snRNA está en posición de catalizar las dos reacciones químicas necesarias para la eliminación del intrón. Según un punto de vista alternativo, las reacciones son catalizadas por la actividad combinada del U6 snRNA y una proteína del U5 snRNP. Con independencia del mecanismo, la primera reacción (indicada por la flecha en el recuadro C) da como resultado la división del sitio de empalme 5′ y forma un exón 5′ libre y un lazo intrón-3′ intermediario de exón (paso 5). Se cree que el exón 5′ libre se mantiene en su lugar por su asociación con el U5 snRNA del espliceosoma, que también interactúa con el exón 3′ (paso 5). La primera reacción de división en el sitio de corte y empalme 5′ es seguida por una segunda reacción de corte en el sitio de corte y empalme 3′ (flecha, paso 5), que divide el lazo intrón y simultáneamente une los extremos de los dos exones vecinos (paso 6). Después del empalme, los snRNP se deben liberar del pre-mRNA, las asociaciones originales entre los snRNA se deben restaurar y los snRNP se deben reensamblar en los sitios de otros intrones.

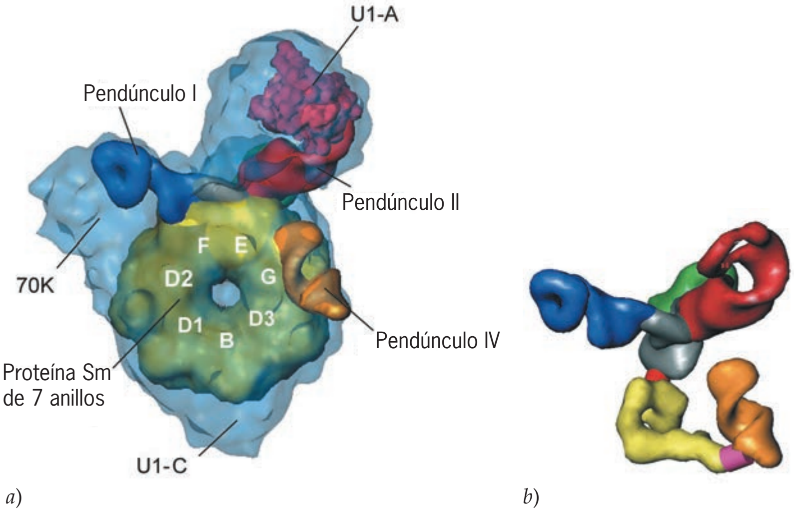



**FIGURA 11-31 Estructura de un snRNP.** *a*) Modelo de una partícula U1 snRNP basada en datos bioquímicos e información estructural obtenida por microscopía crioelectrónica. En el núcleo de la partícula hay un complejo de proteínas en forma de anillo compuesto por las siete proteínas Sm diferentes que son comunes a todos los U snRNP. Otras tres proteínas son exclusivas del U1 snRNP (llamadas 70K, U1-A y U1-C). Los pedúnculos I, II y IV son partes del U1 snRNA de 165 bases. El snRNP se ensambla en el citoplasma y se importa al núcleo, donde lleva a cabo su función. *b*) Un modelo del U1 snRNA en la misma orientación que en *a*. Se puede encontrar un modelo de mayor resolución en *Nature* 2009;458:475.

FUENTE: *a-b*) Holger Stark, *et al*. *Nature* 2001;409:541. Reproducido con permiso de Macmillan Publishers Limited.

la proteína U2AF de la figura 11-30, recuadro A. Al menos ocho helicasas diferentes se han implicado en el empalme de los pre-mRNA en la levadura.

El hecho de que 1) los pre-mRNA estén empalmados por el mismo par de reacciones químicas que ocurren cuando los intrones del grupo II se empalman entre sí y 2) los snRNA que se requieren para empalmar el pre-mRNA se asemejan mucho a las partes de los intrones del grupo II, sugiere que los snRNA son los componentes catalíticamente activos de los snRNP, no las proteínas. Según este escenario, el espliceosoma actuaría como una ribozima, y las proteínas cumplirían varias funciones complementarias, tales como mantener la estructura tridimensional apropiada del snRNA y seleccionar los sitios de empalme que se utilizarán durante el procesamiento de un pre-mRNA particular. De los diversos snRNA que participan en el empalme del RNA, el U6 se considera el candidato más probable para la especie catalítica. Sin embargo, estudios recientes han colocado al menos una de las proteínas del U5 snRNP (a saber, una proteína conservada llamada Prp8) muy cerca del sitio catalítico del espliceosoma. Además, la Prp8 contiene un dominio RNAa que podría ser muy adecuado para dividir el pre-mRNA. Este hallazgo ha revivido la propuesta de que la acción combinada de un RNA y un componente de proteína del espliceosoma es la responsable de catalizar las dos reacciones químicas requeridas para el corte y empalme del RNA.

Se mencionó anteriormente que las secuencias situadas dentro de los exones, llamadas potenciadores exónicos de empalme (ESEs, *exonic splicing enhancers*), desempeñan un papel clave en el reconocimiento de los exones por la maquinaria de corte y empalme. Los ESE sirven como sitios de enlace para una familia de proteínas de unión al RNA denominadas *proteínas SR*, llamadas así debido a su gran cantidad de dipéptidos de arginina (R)-serina (S). Se cree que las proteínas SR forman redes interactivas que abarcan los límites intrón/exón y ayudan a reclutar los snRNP a los sitios de corte y empalme (véase figura 11-30, recuadro A). Las proteínas SR cargadas positivamente también se pueden enlazar electrostáticamente a los grupos fosfato, cargados negativamente, que se agregan al CTD de la polimerasa cuando se inicia la transcripción (consúltese figura 11-18). Como resultado, el ensamblaje de la maquinaria de corte y empalme en un intrón se produce junto con la síntesis del intrón por la polimerasa. Se cree que el CTD recluta una amplia variedad de factores de procesamiento. De hecho, la mayoría de la maquinaria requerida para el procesamiento del mRNA y su exportación al citoplasma viaja con la polimerasa como parte de una "fábrica de mRNA" gigante (véase **FIGURA 11-32**).

Debido a que la mayoría de los genes contienen una cantidad de intrones, las reacciones de empalme representadas en la figura 11-30 deben ocurrir repetidamente en un único transcripto primario. La evidencia sugiere que los intrones se eliminan en un orden preferido y generan productos intermedios de procesamiento específicos, cuyo tamaño se encuentra entre el del transcripto primario y el mRNA maduro. En la **FIGURA 11-33** se muestra un ejemplo de los productos intermedios que se forman durante el procesamiento nuclear del ovomucoide mRNA en las células del oviducto de la gallina.

## REPASO

1. ¿Cuáles son los pasos generales en el procesamiento de un pre-mRNA a un mRNA? ¿Cuál es el papel de los snRNA y el espliceosoma?

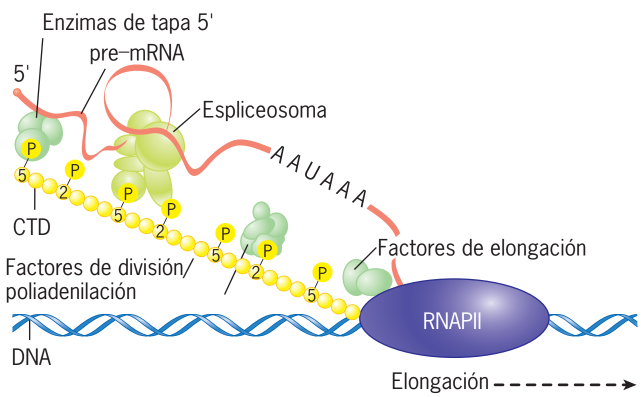



**FIGURA 11-32 Representación esquemática de un mecanismo para la coordinación de la transcripción, colocación de tapa, poliadenilación y empalme.** En este modelo simplificado, el dominio C-terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA polimerasa (página 418) sirve como un andamio flexible para la organización de los factores implicados en el procesamiento del pre-mRNA, incluyendo aquellos para tapar la poliadenilación y la remoción del intrón. Además de las proteínas aquí representadas, la polimerasa probablemente se asocie con un gran grupo de factores de transcripción, así como con enzimas que modifican la plantilla de la cromatina. Las proteínas enlazadas a la polimerasa en cualquier momento particular pueden depender de que los restos de serina del CTD estén fosforilados. El patrón de residuos de serina fosforilados cambia a medida que la polimerasa procede desde el principio hasta el final del gen que se transcribe (comparar con figura 11-18). Los grupos fosfato unidos a los restos #5 se pierden en gran medida cuando la polimerasa transcribe el extremo 3′ del RNA.

FUENTE: EJ Steinmetz. *Cell* 1997;89:493; con el permiso de Cell Press.

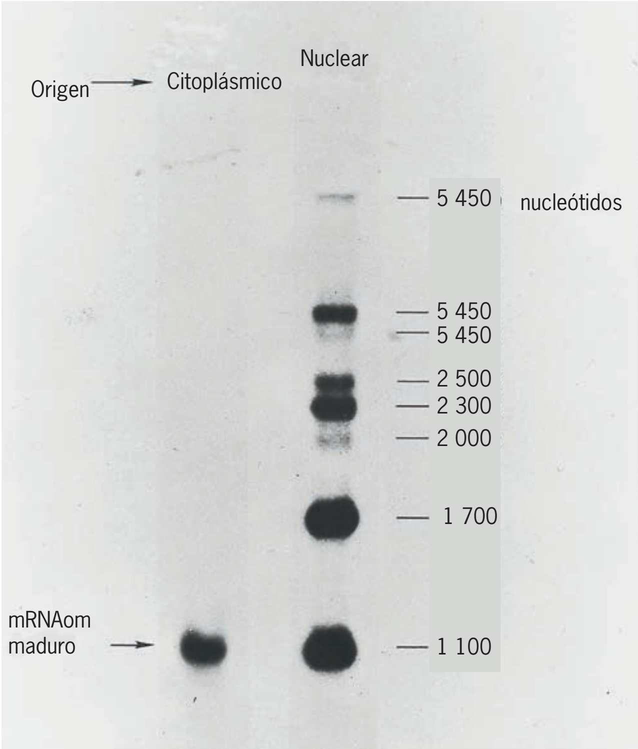



**FIGURA 11-33 Procesamiento del pre-mRNA ovomucoide.** La fotografía muestra una transferencia Northern (*Norther blot*), una técnica en la que el RNA extraído (en este caso del núcleo de células de oviducto de gallina) se fracciona mediante electroforesis en gel, y se transfiere a un filtro de membrana. El RNA inmovilizado en el filtro se incuba a continuación con un cDNA marcado radiactivamente (en este caso un cDNA preparado a partir del mRNA ovomucoide) para producir bandas que revelan las posiciones de los RNA que contienen la secuencia complementaria. El mRNA maduro que codifica la proteína ovomucoide tiene una longitud de 1 100 nucleótidos y se muestra en la parte inferior de la transferencia. Es evidente que el núcleo contiene una serie de RNA de mayor tamaño que también contienen la secuencia de nucleótidos del mRNA ovomucoide. El RNA más grande en la transferencia tiene una longitud de 5 450 nucleótidos, que corresponde al tamaño de la unidad de transcripción ovomucoide; este RNA es presumiblemente la transcripción primaria a partir de la cual se forma finalmente el mRNA. Otras bandas prominentes contienen RNA con longitudes de 3 100 nucleótidos (que corresponde a una transcripción que carece de los intrones 5 y 6) de 2 300 nucleótidos (una transcripción que carece de los intrones 4, 5, 6 y 7) y de 1 700 nucleótidos (una transcripción que carece de todos los intrones excepto el número 3).
FUENTE: Cortesía de Bert O'Malley.

## 11.8 Implicaciones evolutivas de los genes divididos y empalmes de RNA

El descubrimiento de que los RNA son capaces de catalizar las reacciones químicas ha tenido un impacto enorme en nuestra visión de la evolución biológica. Desde el descubrimiento del DNA como material genético los biólogos se han preguntado qué fue primero, proteína o DNA. El dilema surgió de las funciones aparentemente no solapantes de estos dos tipos de macromoléculas. Los ácidos nucleicos almacenan información, mientras que las proteínas catalizan las reacciones. Con el descubrimiento de las ribozimas a principios de la década de 1980 se hizo evidente que un tipo de molécula —el RNA— podía hacer ambas cosas.

El hallazgo de que el RNA puede ser un catalizador condujo a la idea, introducida en el primer capítulo, de un mundo RNA en el que el DNA y la proteína estaban ausentes en las primeras etapas de la evolución de la vida. Durante este periodo las moléculas de RNA realizaron una doble función: sirvieron como material genético y catalizaron reacciones químicas, incluidas las necesarias para la replicación del RNA. Sólo en una etapa posterior de la evolución las proteínas y el DNA asumieron, respectivamente, las funciones de catálisis y almacenamiento de información, lo que dejó al RNA principalmente en la función de intermediario en el flujo de información genética. Muchos investigadores creen que el corte y empalme proporciona un ejemplo de legado de un antiguo mundo RNA.

Aunque la presencia de intrones crea una carga adicional para las células, ya que tienen que eliminar estas secuencias intermedias de sus transcripciones, estos no carecen de virtudes. Como veremos en el siguiente capítulo, el corte y empalme de RNA es uno de los pasos a lo largo del camino hacia la formación del mRNA que está sujeto a regulación celular. Muchos transcriptos primarios se pueden procesar por dos o más vías, de modo que una secuencia que actúa como un intrón en una vía se convierte en un exón en una vía alternativa. Como resultado de este proceso, llamado *splicing alternativo*, el mismo gen puede codificar para más de un polipéptido.

Se cree que la presencia de intrones también tuvo un gran impacto en la evolución biológica. Cuando se examina la secuencia de aminoácidos de una proteína, a menudo se encuentra que contiene secciones que son homólogas a partes de varias otras proteínas (para un ejemplo, véase figura 2-38). Las proteínas de este tipo están codificadas por genes que casi con seguridad son compuestos formados por partes de otros genes. El movimiento de "módulos" genéticos entre genes no relacionados —proceso llamado **mezcla de exones**— se ve facilitado en gran medida por la presencia de los intrones, que actúan como elementos espaciadores inertes entre los exones. Los reordenamientos genéticos requieren rupturas en las moléculas de DNA, que pueden ocurrir dentro de los intrones sin introducir mutaciones que pudieran dañar el organismo. Con el tiempo los exones se pueden mezclar de forma independiente de varias maneras, lo que permite un número casi infinito de combinaciones en la búsqueda de secuencias de codificación nuevas y útiles. Como resultado del intercambio de exones no es necesario que la evolución se produzca sólo por la lenta acumulación de mutaciones puntuales, sino que también puede avanzar mediante "saltos cuánticos" con nuevas proteínas que aparecen en una sola generación.

**REPASO**

1. ¿Qué se entiende por el término *mundo RNA*? ¿Qué tipo de evidencia se argumenta para su existencia?

## 11.9 Creación de nuevas ribozimas en el laboratorio

El principal punto de fricción en la mente de muchos biólogos con respecto a la viabilidad de un mundo RNA, en el que el RNA actuó como único catalizador, es que hasta la fecha sólo unas pocas reacciones han sido catalizadas por RNA *de origen natural*. Estas incluyen la división y unión de enlaces fosfodiéster requeridos para el empalme del RNA, y la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas. ¿Son estos los únicos tipos de reacciones que las moléculas de RNA son capaces de catalizar, o su repertorio catalítico se ha restringido mucho por la evolución de enzimas proteicas más eficientes? Varios grupos de investigadores han explorado el *potencial* catalítico del RNA mediante la creación de nuevas moléculas de RNA en el laboratorio. Aunque estos experimentos nunca pueden demostrar que tales moléculas de RNA existieron en los organismos antiguos, proporcionan pruebas de la *suposición* de que tales moléculas de RNA podrían haber evolucionado a través de un proceso de selección natural.

En un enfoque los investigadores han creado RNA catalíticos desde cero, sin ningún diseño preconcebido sobre cómo debe

construirse el RNA. Los RNA se producen al permitir que las máquinas automatizadas para sintetizar DNA ensamblen DNA con secuencias *aleatorias* de nucleótidos. La transcripción de estos DNA produce una población de RNA cuyas secuencias de nucleótidos también se determinan aleatoriamente. Una vez que se obtiene una población de RNA, los miembros individuales se pueden seleccionar de la población en virtud de las propiedades particulares que poseen. Este enfoque ha sido descrito como "evolución del tubo de ensayo".

En un grupo de estudios, los investigadores seleccionaron al inicio RNA que se unen a aminoácidos específicos y, posteriormente, una subpoblación que transferiría un aminoácido específico al extremo 3′ de un tRNA señalado. Esta es la misma reacción básica llevada a cabo por las aminoacil-tRNA sintetasas, que son enzimas que unen aminoácidos a tRNA según se requiera para la síntesis de proteínas (página 441). Se especula que los aminoácidos pueden haber sido utilizados inicialmente como adjuntos (cofactores) para mejorar las reacciones catalíticas llevadas a cabo por ribozimas. Con el tiempo las ribozimas supuestamente evolucionaron y fueron capaces de unir aminoácidos específicos para formar pequeñas proteínas, que eran catalizadores más versátiles que sus predecesores RNA. Como veremos más adelante en este capítulo, los ribosomas —las máquinas de ribonucleoproteína responsables de la síntesis de proteínas— son en realidad esencialmente ribozimas, lo que proporciona un fuerte respaldo para este escenario evolutivo.

Como las proteínas asumieron una mayor parte de la carga de trabajo en la célula primitiva, el mundo RNA se transformó gradualmente en un "mundo RNA-proteína". En un momento posterior el RNA fue supuestamente reemplazado por DNA como material genético, que propulsó las formas de vida en el presente "mundo DNA-RNA-proteína". La evolución del DNA puede haber requerido sólo dos tipos de enzimas: una ribonucleótido reductasa para convertir ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, y una transcriptasa inversa para transcribir RNA en DNA. El hecho de que los catalizadores de RNA no parezcan estar involucrados en la síntesis ni en la transcripción del DNA respalda la idea de que el DNA fue el último miembro de la tríada DNA-RNA-proteína que apareció en escena.

En algún punto a lo largo de la línea del progreso evolutivo se tuvo que desarrollar un código que permitiera al material genético especificar la secuencia de aminoácidos que se incorporaría a una proteína dada. La naturaleza de este código es el tema de una sección posterior de este capítulo.

**REPASO**

1. ¿Qué se entiende por "evolución de tubo de ensayo" tal como se aplica a la actividad catalítica de las moléculas de RNA?

## 11.10 Interferencia por RNA

La idea de que las moléculas de RNA están directamente involucradas en la regulación de la expresión génica comenzó con una observación desconcertante. Los pétalos de una planta de petunia son normalmente de color púrpura claro. En 1990 dos grupos de investigadores informaron sobre un intento de profundizar el color de los fluidos mediante la introducción de copias adicionales de un gen que codifica una enzima que produce el pigmento. Para sorpresa de los investigadores, la presencia de los genes extra causó que los pétalos perdieran su pigmentación en lugar de tomar una coloración más oscura como se esperaba (consúltese **FIGURA 11-34*a***). Los estudios posteriores indicaron que bajo estas condiciones experimentales tanto los genes añadidos como sus contrapartes normales dentro del genoma se transcribían, pero los mRNA resultantes se degradaron de alguna manera. El fenómeno se hizo conocido como *silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, posttranscriptional gene silencing)*.

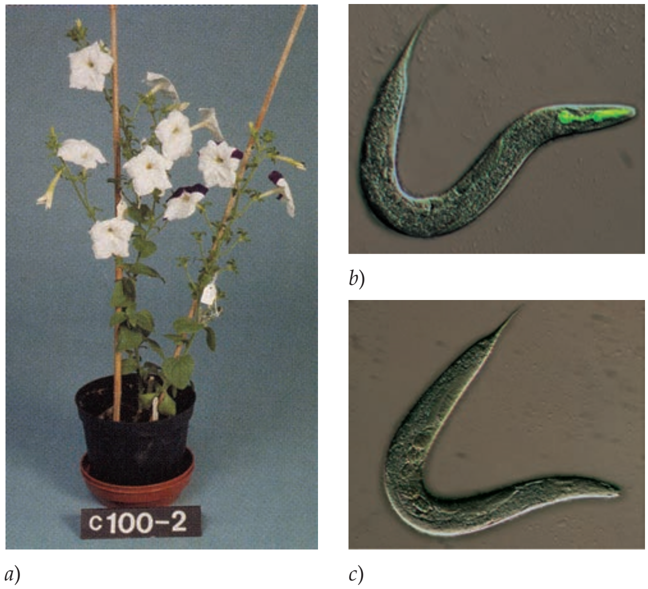



**FIGURA 11-34 Interferencia de RNA.** *a*) Las plantas de petunia normalmente tienen flores de color púrpura. Sus flores aparecen blancas porque las células contienen un gen extra (un transgén) que codifica una enzima requerida para la producción del pigmento. El gen agregado ha activado la interferencia del RNA que conduce a la destrucción específica de los mRNA transcriptos, tanto del transgén como de los propios genes de la planta, lo que provoca que las flores estén en gran parte sin pigmentar. *b*) Gusano nemátodo que contiene un gen que codifica una proteína de fusión GFP (página 260) que se expresa específicamente en la faringe del animal. *c*) Este gusano se desarrolló a partir de un progenitor que contiene el mismo genotipo que el mostrado en *b*, cuya gónada se inyectó con una solución de dsRNA complementaria al mRNA que codifica la proteína de fusión GFP. La ausencia de tinción visible refleja la destrucción del mRNA por la interferencia RNA.

FUENTE: *a*) David Baulcombe. *Curr. Biol* 2002;12:R82, con permiso de Elsevier. Cortesía de David Baulcombe, Sainsbury Laboratory, Norwich, Reino Unido; *b*) Reproducido de www.neb.com (2012) con permiso de New England BioLabs.

No fue hasta 1998 que se comprendieron las bases moleculares de esta forma de silenciamiento génico. En ese año Andrew Fire del Instituto Carnegie de Washington, y Craig Mello y sus colegas de la Universidad de Massachusetts, realizaron un experimento sobre el nemátodo *C. elegans*. Inyectaron estos gusanos con varias preparaciones diferentes de RNA, con la esperanza de detener la producción de una proteína muscular particular. Una de las preparaciones contenía RNA "de sentido"; es decir, un RNA que tenía la secuencia del mRNA que codificaba la proteína blanco; otra preparación contenía RNA "antisentido"; es decir, un RNA que tiene la secuencia complementaria del mRNA en cuestión, y una tercera preparación consistió en un RNA de doble hebra que contiene las secuencias de sentido y antisentido unidas entre sí. Ninguno de los RNA de hebra simple tuvo mucho efecto, pero el RNA de doble hebra fue muy eficaz para detener la producción de la proteína codificada. Fire y Mello describieron el fenómeno como **interferencia por RNA** (RNAi, *RNA interference*). Demostraron que los RNA de doble hebra (dsRNA, *double-stranded RNA*) fueron captados por las células, donde indujeron una respuesta que conduce a la destrucción selectiva de los mRNA que tienen la misma secuencia que el dsRNA añadido. Digamos, por ejemplo, que se intentó detener la producción de la enzima glucógeno fosforilasa dentro de las células de un gusano nemátodo para poder determinar el efecto de esta deficiencia de la enzima sobre el fenotipo del gusano. Es sorprendente que este resultado se pueda lograr con la sencilla colocación del gusano en una solución de dsRNA que comparte la misma secuencia que el mRNA blanco. Un experimento similar se muestra en la figura 11-34*b*),*c*). Este fenómeno es similar en su efecto, aunque totalmente diferente en

el mecanismo, a la formación de ratones *knockout* que carecen de un gen específico que codifica una proteína particular.

El fenómeno de la interferencia de RNA mediada por dsRNA es un ejemplo del fenómeno más amplio del **silenciamiento RNA,** en el que los RNA pequeños, que por lo general trabajan junto con la maquinaria de proteína, actúan para inhibir la expresión génica de diversas maneras. Se cree que la RNAi evolucionó como un tipo de "sistema inmune genético" para proteger a los organismos de la presencia de material genético extraño o no deseado. Para ser más específicos, la RNAi probablemente evolucionó como un mecanismo para bloquear la replicación de virus y/o suprimir los movimientos de transposones dentro del genoma, porque ambos procesos potencialmente peligrosos pueden implicar la formación de RNA de doble hebra. Las células pueden reconocer los dsRNA como "indeseables" porque sus actividades genéticas normales no producen tales moléculas.

Los pasos implicados en la ruta de la RNAi se muestran en la **FIGURA 11-35*a***. El RNA de doble hebra que inicia la respuesta se divide primero en fragmentos pequeños (21-23 nucleótidos) de doble hebra llamados **RNA pequeños interferentes (siRNA)**, por un tipo particular de ribonucleasa llamada Dicer. Las enzimas de la clase a la que pertenece la Dicer actúan específicamente sobre sustratos de dsRNA, y generan pequeños dsRNA que tienen proyecciones 3′, como se muestra en la figura 11-35*a*). Estos pequeños dsRNA se cargan luego en un complejo (identificado como un *pre-RISC* en la figura 11-35*a*) que contiene un miembro de la familia de proteínas Argonauta. Las proteínas Argonauta desempeñan un papel clave en todas las vías conocidas de silenciamiento del RNA. En la vía de la RNAi, una de las hebras del dúplex de RNA (llamada hebra pasajera) se divide en dos y luego se disocia del pre-RISC. La otra hebra del dúplex de RNA (llamada hebra guía) se incorpora, junto con su compañero Argonauta, en un complejo proteico relacionado llamado RISC. Se han identificado variedades de RISC, que se distinguen por la proteína Argonauta particular que contienen. En las células malignas los RISC que contienen un siRNA suelen incluir la proteína Ago2 de Argonauta. El RISC proporciona la maquinaria para que el pequeño siRNA de hebra simple se una a un RNA que tiene una secuencia complementaria. Una vez unido el RNA blanco se divide en un sitio específico mediante la actividad ribonucleasa de la proteína Ago2. Por tanto, el siRNA actúa como una guía para dirigir el complejo hacia un RNA blanco complementario, que luego es destruido por una proteína asociada. Cada siRNA puede orquestar la destrucción de numerosas copias del RNA blanco, que podría ser una transcripción viral, un RNA transcripto de un transposón o retrotransposón, o un mRNA hospedador al que apunta un investigador, como se describe al principio de esta sección.

La interferencia por RNA se ha estudiado principalmente en plantas y gusanos nemátodos. Los vertebrados no parecen utili-

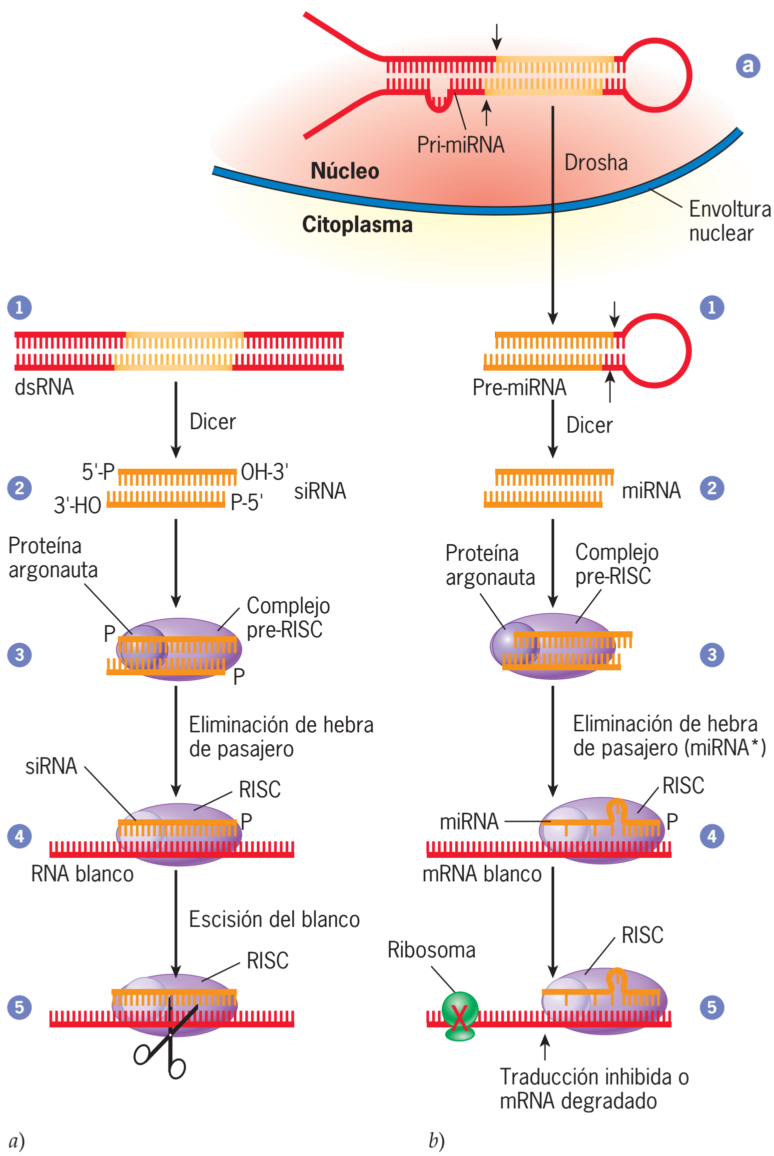



**FIGURA 11-35 Formación y mecanismo de acción de siRNA y miRNA.** *a*) En el paso 1, ambas hebras de un RNA de doble hebra se dividen mediante la endonucleasa Dicer para formar un siRNA pequeño (2-3 nucleótidos), que tiene extremos salientes (paso 2). En el paso 3 el siRNA se asocia con un complejo proteico, un pre-RISC, que contiene una proteína Argonauta (típicamente la Ago2) capaz de dividir y eliminar la hebra pasajera del dúplex de siRNA. En el paso 4 el siRNA guía de hebra simple, en asociación con las proteínas del complejo RISC, se une a un RNA blanco que tiene una secuencia complementaria. El RNA blanco puede ser un RNA viral, una transcripción de un transposón, o un mRNA, en dependencia de las circunstancias. En la etapa 5 la proteína Argonauta escinde el RNA blanco en un sitio específico y posteriormente este se degrada. *b*) Los microRNA se derivan de RNA precursores monocatenarios, que contienen secuencias complementarias que les permiten plegarse sobre sí mismos para formar un RNA bicatenario con un pedúnculo-lazo en un extremo (paso a). Este pseudodsRNA (o pri-miRNA) se divide en un sitio específico cerca de su lazo terminal, mediante un complejo de proteína –que contiene una endonucleasa llamada Drosha– para generar un pre-miRNA que tiene un saliente 3′ en un extremo. El pre-miRNA se exporta al citoplasma (paso 1) donde la Dicer lo divide en un miRNA dúplex pequeño (paso 2) que tiene un saliente 3′ en ambos extremos. En el paso 3 el RNA de doble hebra se asocia con un complejo proteico que contiene una proteína Argonauta (suele ser Ago1), que conduce a la separación de las hebras y a la eliminación de la hebra pasajera (denominada miRNA*). La guía de hebra simple miRNA después se une a una región complementaria en un mRNA (paso 4), e inhibe la traducción del mensaje como se muestra en el paso 5 (o en forma alterna, conduce a la desadenilación y degradación del mRNA como se discutió en la sección 12.20). A diferencia de los siRNA, los miRNA que inhiben la traducción son sólo parcialmente complementarios al mRNA blanco, de ahí la protuberancia. La mayoría de miRNA de plantas, y algunos miRNA animales, son precisamente complementarios al mRNA, o casi lo son; en estos casos el resultado de la interacción tiende a ser la segmentación del mRNA por la Ago2, de la misma manera que se muestra en *a*. (Una cierta clase de miRNA derivados de intrones no forman pri-miRNA de horquilla larga y no requieren Drosha para su procesamiento).

zar la RNAi como una defensa contra virus, sino que se basan en un sistema inmune bien desarrollado.[5] De hecho, cuando un dsRNA se agrega a células de mamíferos que crecen en cultivo, o se inyectan directamente en el cuerpo de un mamífero, en lugar de detener la traducción genética de una proteína *específica* usualmente dan inicio a una respuesta *global* que inhibe la síntesis de proteínas en general. Se piensa que este cierre global de la síntesis de proteínas (discutido en la sección 17.1) ha evolucionado como un medio para proteger las células de la infección por virus. Para soslayar esta respuesta global a gran escala, los investigadores recurrieron al uso de dsRNA muy pequeños. Descubrieron que la introducción en células de mamífero de dsRNA sintéticos que tenían una longitud de 21 nucleótidos (es decir, de tamaño equivalente a los siRNA producidos como intermediarios durante la interferencia de RNA en otros organismos) no desencadenó la inhibición *global* de la síntesis de proteínas. Además, dichos dsRNA eran capaces de la RNAi, es decir, inhibían la síntesis de la proteína específica codificada por un mRNA que tiene una secuencia de nucleótidos coincidente. Las proteínas codificadas por otros mRNA por lo general no se vieron afectadas. Esta técnica se ha convertido en una importante estrategia experimental para aprender más sobre la función de genes específicos. Uno puede simplemente bloquear (o más exactamente, noquear) la actividad del gen específico en cuestión, utilizando dsRNA para destruir los mRNA transcriptos, y buscar cualquier anormalidad celular que resulte de una deficiencia de la proteína codificada (véase figura 8-8 para un ejemplo). Ahora están disponibles bibliotecas que contienen siRNA apuntados a cada gen en todo el genoma. Con la ayuda de robots de laboratorio es posible usar estas bibliotecas para identificar en el genoma completo todos los genes que se requieren para un proceso de interés en un solo estudio. La posible importancia clínica de la RNAi se discute en la "Perspectiva humana" correspondiente.

[5] Los mamíferos poseen todos los componentes necesarios para generar siRNA. Estudios recientes han indicado que los siRNA endógenos (o endo-siRNA, como se les llama) se producen en ovocitos de mamíferos y células madre embrionarias, en parte como un mecanismo de defensa contra el movimiento de elementos transponibles en estas células. La formación de endo-siRNA en ovocitos de mamífero se lleva a cabo mediante un Dicer específico de ovocito que, en contraste con el Dicer encontrado en las células somáticas, es extremadamente bueno en producir siRNA a partir del dsRNA.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son los pasos por los cuales el RNA de doble hebra se convierte en siRNA y luego se usa para destruir un RNA blanco?

# 11.11 PERSPECTIVA HUMANA

## Aplicaciones clínicas de la interferencia por RNA

El desarrollo de medicamentos es un proceso largo y difícil. Como se discutió en el capítulo 2, los medicamentos a menudo funcionan por inhibición de las proteínas involucradas en una enfermedad. A veces es posible utilizar la estructura tridimensional de una proteína involucrada en una enfermedad para desarrollar productos químicos que específicamente inhibirán esa proteína. Sin embargo, a pesar de éxitos como el Gleevac, discutidos en la figura 2-51, en general este enfoque ha demostrado ser extremadamente difícil y propenso a fallos. El descubrimiento de la RNAi, con su capacidad para reducir la expresión de cualquier gen de interés con sólo introducir un corto siRNA en una célula, sugirió un enfoque diferente para desarrollar terapias: en lugar de hacer una pequeña sustancia química que inhiba a una enzima blanco uniéndose a su sitio activo, uno podría obtener el mismo resultado usando la RNAi para apuntar al gen que codifica la enzima. Esto llevaría a una menor actividad enzimática, tal como lo haría un inhibidor químico, pero el agente terapéutico sería mucho más fácil de diseñar, simplemente al observar la secuencia del gen. Además, el siRNA tiene menos probabilidades de sufrir lo perjudicial de todos los esfuerzos en el descubrimiento de fármacos: los efectos fuera del blanco. Un efecto fuera del blanco ocurre cuando un medicamento diseñado para inhibir una proteína inhibe accidentalmente una o varias proteínas más. Como los fármacos químicos son pequeños, es fácil para ellos entrar en una variedad de bolsas de unión en diferentes proteínas, lo que hace extremadamente difícil asegurar una unión específica a un solo objetivo de interés. A menudo los efectos fuera del blanco no se notan hasta que los ensayos clínicos se llevan a cabo en pacientes humanos. Esta falta de especificidad es un problema importante en la industria de búsqueda de medicamentos. La RNAi es potencialmente mucho más específica, porque cualquier siRNA potencial se puede comparar con el genoma humano completo para garantizar que sólo sea complementario a un único gen de interés, y no a cualquier otro. Por estas razones ha habido una tremenda inversión en el desarrollo de terapias basadas en siRNA.

Existen dos formas de producir una respuesta RNAi en células humanas. La primera es la adición de moléculas de siRNA sintéticas. Cuando las células se incuban con un siRNA sintético de 21 a 23 nucleótidos, las células captan las moléculas que se incorporan en un complejo de ribonucleoproteína mRNA-divisor que ataca el mRNA complementario (como en la figura 11-35*a*). El segundo enfoque es exponer las células a virus que pueden insertar una construcción de DNA con repeticiones invertidas en el genoma del huésped. Cuando la construcción se transcribe, el producto de RNA se repliega sobre sí mismo para formar un precursor siRNA en forma de horquilla (es decir, de doble hebra, similar al de la figura 11-35*b*) que se procesa a un siRNA activo. Es probable que el uso de siRNA sintéticos tenga un efecto transitorio, que puede o no ser beneficioso según la afección que se trate. En contraste, el uso de vectores virales que incorporan DNA en el genoma de la célula tiene el potencial de generar un efecto terapéutico duradero con una sola aplicación. Desafortunadamente los virus pueden desencadenar reacciones inmunológicas masivas, y han caído en desuso como método para administrar terapias basadas en la RNAi.

Como en todas las tecnologías farmacológicas potenciales, las primeras etapas en el desarrollo de la terapéutica con la RNAi incluyeron estudios preclínicos en los que se probó siRNA en células de pacientes enfermos o en modelos animales (es decir, animales con enfermedades inducidas similares a las que afectan a humanos). Muchos de estos estudios preclínicos sugirieron que la RNAi era muy prometedora en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades e infecciones virales. Podemos considerar sólo unos pocos ejemplos. Como se indicó con anterioridad, es típico que las células cancerosas contengan uno o más genes mutados que codifican proteínas anormales, responsables de producir el fenotipo canceroso. Por ejemplo, un tipo de leucemia es causada por un gen llamado *BCR-ABL*, que se forma por la fusión de dos genes normales. Un siRNA contra el mRNA producido por el gen de fusión *BCR-ABL* demostró en cultivo ser capaz de convertir las células malignas en un fenotipo normal. De manera similar se demostró que un siRNA contra un gen que porta un tracto de CAG expandido, del tipo que causa la enfermedad de Huntington (página 388), bloquea la producción de la proteína anormal.

Numerosos estudios preclínicos que exploran el valor terapéutico de los siRNA se han centrado en la infección viral. La administración de siRNA complementarios a las secuencias virales de influenza, HIV, o hepatitis, ha evitado o eliminado las infecciones por estos virus en animales de laboratorio. En el caso del sida se espera que las células madre se puedan aislar de un paciente, se transfecten con un vector que contenga un siRNA que se dirija a un mRNA codificado por el HIV, y luego se redisuelva nuevamente en el torrente sanguíneo del paciente. Tales células tienen el potencial de producir el siRNA de forma más o menos continua, lo que hace que la célula y sus descendientes sean resistentes a la destrucción por el virus. Sin embargo, existen obstáculos en el uso de la RNAi para tratar infecciones virales. El sello distintivo de la RNAi es su extraordinaria secuencia de especificidad, que puede ser a la vez una virtud y una desventaja. En última instancia, la RNAi puede resultar ineficaz contra los virus, ya que estos patógenos tienden a mutar rápidamente. Las mutaciones producen cambios en la secuencia del genoma, lo que lleva a la producción de mRNA que ya no son completamente complementarios al siRNA terapéutico.

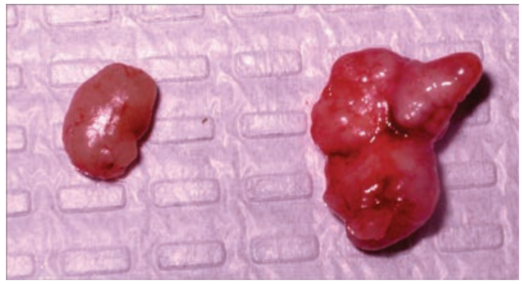


**FIGURA 1 La PLK1 como blanco para la terapia del cáncer.** Tumores de un ratón al que se le insertaron células que portan mutaciones genéticas que predisponen a las células a producir tumores. El tumor de la izquierda procedía de células tratadas con un inhibidor de la PLK1, lo que demuestra que el crecimiento del tumor es muy reducido en comparación con los tumores no tratados, como se muestra a la derecha.

FUENTE: Luo, *et al*. *Cell* 2009;137:83-48.

La tecnología siRNA es la base de una creciente lista de ensayos clínicos. La primera prueba terapéutica de la RNAi en pacientes humanos vino contra una forma de degeneración macular, causada por el crecimiento excesivo de vasos sanguíneos detrás de la retina de pacientes de edad avanzada, que conduce a la pérdida progresiva de la visión. La producción de un factor de crecimiento, VEGF, que induce su efecto al unirse al receptor VEGFR1 de la superficie celular estimula el crecimiento excesivo de estos vasos sanguíneos. En ensayos clínicos el siRNA dirigido al mRNA que codifica el VEGF se inyectó directamente en los ojos de pacientes con esta enfermedad. Los ensayos en etapas iniciales sugirieron que el siRNA estaba teniendo un efecto beneficioso, pero los ensayos de fase III en etapas posteriores no lograron respaldar los hallazgos y se suspendió el trabajo con el medicamento (llamado Bevasiranib). Otro siRNA inicialmente prometedor para el tratamiento de la degeneración macular, ANG-745, resultó ser ineficaz en los ensayos de fase II y también se ha detenido su desarrollo. La degeneración macular y otras enfermedades oftalmológicas siguen siendo vistas como candidatos prometedores para la terapia de siRNA, porque es muy fácil aplicar las moléculas de siRNA directamente al ojo, ya sea por inyección o en gotas oculares.

Otra serie de pruebas clínicas se realizaron utilizando la terapia de siRNA contra un virus respiratorio, RSV, causa común de hospitalización infantil. En estos ensayos, los sujetos adultos inhalaron un aerosol que contiene un siRNA (llamado ALN-RSV01) dirigido contra los mRNA que codifican una proteína viral clave. Un ensayo inicial de fase II sugirió que el tratamiento fue efectivo para reducir los niveles de virus sin causar efectos secundarios peligrosos, pero falló un segundo ensayo de fase II y el tratamiento aún no se ha estudiado en ensayos adicionales.

La degeneración macular asociada a la edad, y la infección respiratoria por RSV, no son enfermedades típicas en el sentido de que se pueden tratar con la aplicación local de una RNAi terapéutica, lo que facilita el suministro del siRNA directamente a las células. De hecho, los ojos, los pulmones y la piel han sido los blancos principales de las terapias de siRNA desarrolladas hasta el momento, simplemente por razones de fácil acceso al tejido. Para las enfermedades que afectan a otros tejidos y órganos, la dificultad en la entrega de siRNA a los tejidos afectados es un obstáculo importante. En un intento por cumplir con este desafío se ha desarrollado una variedad de partículas de tamaño nanométrico que 1) se unen a los siRNA o los encapsulan y 2) dirigen los siRNA al tejido u órgano apropiado después de su inyección en el torrente sanguíneo. Tales nanopartículas se pueden inyectar en el torrente sanguíneo donde viajan a órganos como el riñón o el hígado. Uno de esos siRNA encapsulados en nanopartículas, el TKM-PLK1, se dirige a una enzima llamada quinasa tipo polo I (PLK1, *polo-like kinase I*), importante en la regulación de la división celular. Los experimentos de laboratorio muestran que la reducción de la actividad de la PLK1 conduce a la muerte celular de las células cancerosas, y puede reducir el crecimiento tumoral (obsérvese **FIGURA 1**), por lo que la PLK1 es un objetivo prometedor para la terapia del cáncer basada en el siRNA. La nanopartícula de siRNA TKM-PLK1 viaja al riñón para administrar el siRNA, y en la actualidad se está evaluando en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del carcinoma adrenocortical (ACC, *adrenocortical carcinoma*), un cáncer que afecta las células de la glándula suprarrenal ubicada cerca del riñón. Otro siRNA encapsulado en nanopartículas llamado Patisiran está diseñado para tratar una enfermedad genética llamada amiloidosis mediada por transtiretina o ATTR. La causa de la ATTR es una mutación en el gen que codifica la proteína transtiretina (TTR), que normalmente está involucrada en el transporte de vitamina A. En la ATTR la mutación causa que la proteína TTR se pliegue incorrectamente y se acumule en nudos de proteínas, tanto en el sistema nervioso como en el corazón, lo que lleva a la neuropatía y a la enfermedad cardiaca. El siRNA Patisiran toma a la TTR como blanco, reduciendo su producción con la finalidad de reducir el nivel de proteínas mal plegadas. El Patisiran se encontró seguro y efectivo en ensayos de fase II, y ahora se está sometiendo a ensayos clínicos de fase III.

Hasta la fecha, más de 30 productos terapéuticos basados en siRNA han sido probados en ensayos clínicos, muchos de los cuales aún están en curso. Hasta el momento ninguno de estos ha obtenido la aprobación de la FDA para su uso en pacientes, pero la esperanza en este enfoque no ha disminuido. Están planeados, o en marcha, ensayos clínicos de siRNA dirigidos al tratamiento del colesterol alto en sangre, ciertos cánceres, hepatitis, gripe pandémica y otras enfermedades. Los estudios aquí descritos son sólo los primeros pasos en una larga vía de investigación, pero sugieren que la interferencia por RNA se pudiera convertir algún día en una estrategia terapéutica valiosa contra una amplia gama de trastornos.

## 11.12 RNA pequeños: miRNA y piRNA

En 1993 se sabía que los embriones de *C. elegans* que carecían del gen *lin-4* no se podían convertir en larvas normales en la última etapa. En ese año Victor Ambros, Gary Ruvkun, y sus colegas de la Universidad de Harvard informaron de que el gen *lin-4* codifica un pequeño RNA que es complementario a los segmentos en la región no traducida 3′ de un mRNA específico que codifica a la proteína LIN-14. Propusieron que durante el desarrollo de la larva el RNA *lin-4* se enlaza al mRNA complementario, bloquea la traducción del mensaje, lo que dispara una transición a la siguiente etapa de desarrollo. Los mutantes que no pueden producir el

pequeño RNA *lin-4* poseen un nivel anormalmente alto de la proteína LIN-14 y no pueden pasar normalmente a etapas larvarias posteriores. Este fue el primer ejemplo claro de silenciamiento del RNA de la expresión génica, pero pasaron varios años antes de que se apreciara la importancia más amplia de estos hallazgos. En el 2000 se demostró que uno de estos RNA gusanos diminutos, una especie de 21 nucleótidos llamada *let-7*, está muy bien conservado a través de toda la evolución. Los humanos, por ejemplo, codifican varios RNA que son idénticos, o casi idénticos, a la *let-7*. Esta observación condujo a una explosión de interés en estos RNA.

## Los miRNA: una clase de RNA pequeños que regulan la expresión génica

Se ha hecho evidente en los últimos años que las plantas y los animales producen una colección de pequeños RNA nombrados microRNA (miRNA), que debido a su pequeño tamaño habían sido pasados por alto durante décadas. Como se descubrió por primera vez en nemátodos, miRNA específicos tales como *lin-4* y *let-7* sólo se sintetizan en ciertos momentos durante el desarrollo, o en ciertos tejidos de una planta o animal, y se cree que desempeñan una función reguladora. En la **FIGURA 11-36** aparece un ejemplo de la expresión selectiva de miRNA específicos durante el desarrollo del pez cebra. El tamaño de los miRNA de aproximadamente 2-4 nucleótidos de longitud los coloca en el mismo rango de tamaño que los siRNA implicados en la RNAi. Esta observación es más que una coincidencia, porque los miRNA son producidos por una maquinaria de procesamiento similar a la responsable de la formación de siRNA. Los miRNA y los siRNA se pueden considerar como "primos", ya que ambos actúan en vías de silenciamiento del RNA postranscripcional. Sin embargo, hay diferencias importantes. Un siRNA se deriva del producto de doble hebra de un virus o elemento transponible (o de un dsRNA proporcionado por un investigador), y se dirige a las mismas transcripciones de las que surgió. Por el contrario, un miRNA está codificado por un segmento convencional del genoma, y se dirige a un mRNA específico como parte de un programa celular normal. En otras palabras, los siRNA sirven principalmente para mantener la integridad del genoma, mientras que los miRNA sirven principalmente para regular la expresión génica.

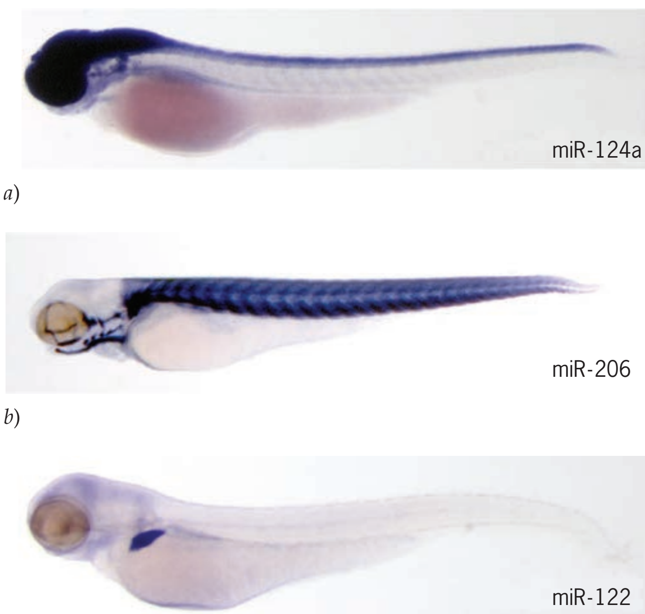



**FIGURA 11-36 Los microRNA se sintetizan en tejidos específicos durante el desarrollo embrionario.** Estas micrografías de embriones de pez cebra muestran la expresión específica de tres miRNA diferentes cuya localización está indicada por la tinción azul. El miR-124a se expresa específicamente en el sistema nervioso *a*); el miR-206, en el músculo esquelético *b*), y el miR-122, en el hígado *c*).

FUENTE: *a-c*) de Erno Wienholds, Wigard Kloosterman, *et al*. *Science* 2005;309:311, cortesía de Ronald H. A. Plasterk; © 2005, reimpreso con permiso de AAAS.

En la figura 11-35*b*) se muestra la ruta para la síntesis de un miRNA típico. La RNA polimerasa II sintetiza la mayoría de los miRNA como una transcripción primaria con una tapa de 5′ y una cola de poli(A). Esta transcripción primaria se repliega sobre sí misma para formar un RNA largo de doble hebra, en forma de alfiler, llamado *pri-miRNA*, que se muestra en el paso *a* de la figura 11-35*b*). El pri-miRNA se divide dentro del núcleo por una enzima llamada Drosha en un precursor más corto de doble hebra (o pre-miRNA) en forma de horquilla, que se muestra en el paso 1. El pre-miRNA se exporta al citoplasma donde da origen a un pequeño miRNA de doble hebra. La Dicer, la misma ribonucleasa responsable de la formación de siRNA, corta el miRNA del pre-miRNA. Al igual que con los siRNA, el miRNA de doble hebra se asocia con una proteína Argonauta en cuya compañía se desensambla el dúplex de RNA, y una de las hebras simples se incorpora a un complejo RISC como se muestra en la figura 11-35*b*).

Un miRNA típico en células animales es parcialmente complementario a una región en el 3′ UTR del mRNA blanco (como en la figura 11-35*b*). En estos casos el apareamiento de bases implica seis o siete nucleótidos cerca del extremo 5′ del miRNA (por lo general nucleótidos 2-8 del miRNA), que se conoce como la región de "semilla", así como algunos pares de bases adicionales en otros lugares del miRNA. El miRNA del complejo RISC guía la proteína Argonauta asociada a la proximidad del mRNA enlazado. Como se discutió en la sección 12.20, la proteína Argonauta provoca la degradación del mRNA, o la represión de su traducción (véase figura 12-63). Se ha formulado la hipótesis de que la represión translacional podría en sí misma conducir a la degradación posterior del mRNA, y que la función principal de la unión de miRNA a la Argonauta sería bloquear la traducción, que entonces activa la degradación del mRNA. Sin embargo algunos miRNA, en particular los que se encuentran en las plantas, dirigen la división de un enlace fosfodiéster específico dentro de la hebra principal del mRNA. Al igual que con los siRNA que se muestran en la figura 11-35*a*), la división del mRNA está catalizada por una actividad "rebanadora" de la proteína Ago2 presente en el complejo RISC. Los microRNA que dirigen la división del mRNA tienden a ser totalmente complementarios a su mRNA blanco en lugar de ser complementarios a sólo una parte de su objetivo.

Los genes de microRNA se han identificado de varias maneras diferentes: más a menudo a partir del análisis por computadora de secuencias de DNA genómico, pero también mediante el aislamiento de mutantes, o de la secuenciación directa de pequeños RNA celulares. Los estimados sugieren que los humanos pueden codificar más de mil especies distintas de miRNA. Aproximadamente un tercio de los RNA mensajeros humanos contienen secuencias que son complementarias a probables miRNA, lo que proporciona una pista del grado en que estos pequeños reguladores RNA pueden estar implicados en el control de la expresión génica en organismos superiores. Un solo miRNA puede unirse a docenas, o incluso a cientos de diferentes mRNA. A la inversa, muchos mRNA contienen secuencias que son complementarias a varios miRNA diferentes, lo que sugiere que estos miRNA pueden actuar en diversas combinaciones para ajustar el nivel de la expresión génica. Esta predicción está respaldada por experimentos donde las células se ven obligadas a tomar y expresar genes específicos de miRNA. En estas condiciones un gran número de mRNA en las células genéticamente modificadas se

ven afectados negativamente. Cuando se introducen genes de miRNA diferentes en estas células, se regulan los distintos grupos de mRNA, lo que indica que el efecto es específico de la secuencia. Este tipo de ajuste fino de los niveles de expresión del mRNA por los miRNA contrasta marcadamente con los efectos mucho más drásticos de ciertos miRNA, como el *lin-4*, que reducen la expresión de un mRNA blanco al punto que activa un cambio importante en el curso del desarrollo (página 433).

Los microRNA se han implicado en muchos procesos, incluidos la configuración del sistema nervioso, el control de la proliferación celular y la muerte celular, el desarrollo de hojas y flores en las plantas, y la diferenciación de diversos tipos de células. Los roles de los miRNA en el desarrollo del cáncer se exploran al final de la sección 16.11. La disección de los roles de los miRNA individuales durante el desarrollo de los mamíferos y la homeostasis tisular es actualmente un foco de intensa investigación.

### Los piRNA: una clase de RNA pequeños que funcionan en células germinales

Hemos visto en el capítulo 10 que el movimiento de elementos transponibles representa una amenaza para el genoma, porque puede interrumpir la actividad de un gen en el que se inserta el elemento. Si este tipo de salto genómico ocurriera durante la vida de un hígado o riñón adulto, las consecuencias probablemente serían mínimas porque el evento de transposición afecta sólo a esa célula en particular y a sus hijas (si la célula somática aún es capaz de dividir las células). Sin embargo, si ocurriera un evento de transposición en una célula germinal, es decir, una célula que tiene la capacidad de dar origen a gametos, entonces el evento tiene el potencial de afectar a cada célula en un individuo de la próxima generación. No es sorprendente, por tanto, que hayan evolucionado mecanismos especializados para suprimir el movimiento de elementos transponibles en las células germinales.

Se observó en la página 431 que una de las funciones aparentes de los siRNA es evitar el movimiento de elementos transponibles. Estudios recientes indican que las células germinales de los animales expresan una clase distinta de RNA pequeños, llamados **RNA piwi-interactuantes** (o piRNA) que suprimen el movimiento de elementos transponibles en la línea germinal. Los piRNA obtienen su nombre de las proteínas con las que se asocian específicamente. Estas proteínas se denominan PIWI, y son una subclase de la familia Argonauta, la misma familia de proteínas que se asocian con siRNA y miRNA como parte de sus complejos RISC. El papel de las proteínas PIWI se ha estudiado mejor en la mosca de la fruta, donde la eliminación de dichas proteínas conduce a defectos en la supresión del movimiento del transposón en las células germinales, y en última instancia a la falla en la formación de gametos. Los piRNA y sus proteínas PIWI asociadas también son necesarias para la formación exitosa de gametos en ratones machos, aunque no en ratones hembra (donde la protección contra elementos transponibles puede ser proporcionada principalmente por los endo-siRNA discutidos en la nota al pie de la página 432).

Hay una serie de diferencias importantes entre los piRNA por un lado y los si/mi RNA por el otro: 1) los piRNA son más largos que estos otros RNA pequeños, que miden aproximadamente 2-2 nucleótidos de longitud; 2) la mayoría de los piRNA de mamíferos se pueden mapear a un pequeño número de grandes *loci* genómicos, algunos de los cuales pueden codificar miles de piRNA diferentes; 3) los piRNA pueden estar sujetos a un proceso de amplificación que genera copias adicionales de piRNA, y 4) la formación de piRNA no implica la formación de precursores de dsRNA o división por la ribonucleasa Dicer. En cambio, la biogénesis de los piRNA parece depender de una endonucleasa de RNA monocatenaria llamada Zucchini, que actúa sobre un transcripto primario largo de hebra simple para liberar los piRNA cortos. Aquellos piRNA que están activos en la célula contra elementos transponibles se amplifican en una etapa posterior. El mecanismo por el cual los piRNA actúan para silenciar la expresión del RNA blanco sigue sin estar claro, aunque en algunos tipos de células el silenciamiento se logra modificando el estado de la cromatina como se discutió en el capítulo 12.

**REPASO**

1. ¿Qué es un siRNA, un miRNA y un piRNA? ¿Cómo se forma cada uno de ellos en la célula? ¿Cuáles son sus funciones propuestas?

## 11.13 CRISPR y otros RNA no codificantes

Tanto el siRNA como el piRNA evolucionaron como defensa contra elementos genómicos peligrosos, genomas virales o transposones. La principal diferencia radica en cómo surgen: los siRNA se producen por cualquier hebra doble de RNA en la célula, que es el sello distintivo de un genoma viral, mientras que los piRNA están codificados en el genoma del huésped, y proporcionan al anfitrión una defensa genéticamente codificada, listos para atacar cualquier transcripción con una secuencia similar. Esta última estrategia también es empleada por muchas bacterias a través de una ruta basada en el RNA conocida como CRISPR.

### CRISPR: RNA no codificante en bacterias

Dentro del genoma de muchas bacterias hay *loci* genómicos que contienen segmentos de DNA cortos, idénticos a las secuencias del DNA de virus de bacteriófagos, separados por una secuencia repetida de DNA. Estos *loci* repetidos se denominan repeticiones palindrómicas cortas agrupadas de forma regular entre fases, o CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Las secuencias virales se obtienen de virus que invadieron a los ancestros de la célula bacteriana, y su presencia en el genoma bacteriano constituye una memoria de tales ataques previos. El *locus* CRISPR se transcribe como una molécula de RNA de hebra simple larga, muy similar al precursor piRNA. Entonces las pequeñas secuencias de RNA individuales, llamadas RNA de guía única (sgRNA, *single-guide RNA*) o RNA CRISPR (crRNA, *CRISPR RNA*) se cortan y se cargan en una proteína llamada cas9. La cas9 usa el sgRNA enlazado para localizar objetivos y divide cualquier DNA con homología de secuencia con el RNA guía. Aunque este sistema evolucionó en bacterias para defenderse contra los virus mediante la división de los genomas del DNA viral, el sistema CRISPR-cas9 se ha desarrollado por ingeniería genética para trabajar en células eucarióticas. Al expresar la cas9 en una célula junto con una secuencia de guía única adecuada, es posible crear roturas DNA de doble hebra en el genoma de la célula. Cuando la célula intenta reparar estos cortes puede conducir a inserciones o deleciones de DNA, lo que produce un gen mutante. El sistema CRISPR-cas9 permite así que se formen mutantes en cualquier gen de interés. Además, el proceso de reparación puede conducir a un reordenamiento cromosómico posterior, o a la inserción de nuevas secuencias de DNA que comparten homología con la región del corte, lo cual permite que el genoma se edite o modifique a voluntad. La capacidad de crear mutantes y realizar la edición del genoma, en prácticamente cualquier organismo mediante el sistema CRISPR-cas9, ha llevado a una revolución en la manipulación genética de las células, especialmente en organismos tales

como mamíferos y plantas en los que la modificación genética dirigida había sido extremadamente difícil.



### Otros RNA no codificantes

A medida que el campo de la biología celular y molecular ha madurado, hemos aprendido poco a poco a apreciar la notable diversidad estructural y funcional de las moléculas de RNA. En las últimas décadas nuevos tipos de RNA se han descubierto con frecuencia, tal como se describe en las páginas anteriores de este texto. Pero los investigadores no han estado preparados para una explosión de hallazgos, que indican que *al menos* dos tercios del genoma de un ratón o humano se transcriben normalmente, mucho más de lo que cabría esperar en función del número de secuencias "significativas" de DNA que se piensa están presentes. De hecho, la mayoría de las secuencias incluidas en este DNA transcrito normalmente se consideran "basura", incluyendo un gran número de elementos transponibles que constituyen una fracción considerable de los genomas de mamíferos (página 394). Algunos estudios plantean la cuestión de si existe alguna diferencia básica entre un gen y una región intergénica; informan que la transcripción puede comenzar en todo tipo de sitios inesperados dentro del genoma, y que las transcripciones se superponen ampliamente entre sí. Otros estudios revelan que las células a menudo transcriben ambas hebras de un elemento de DNA y producen tanto un *RNA sentido* como un *RNA antisentido*. Algunos RNA antisentido se sintetizan mediante polimerasas que inicialmente se unieron al promotor de un gen codificador de proteínas, y después se movieron corriente arriba de ese sitio a lo largo de la hebra opuesta del cromosoma; es decir, en la dirección *opuesta* a las moléculas de polimerasa que están transcribiendo el gen a sí mismo.

Así como el DNA de una célula u organismo constituye su genoma y las proteínas que produce constituyen su proteoma, los RNA sintetizados por una célula u organismo constituyen su **transcriptoma**. ¿Por qué el transcriptoma de una célula de mamífero es tan grande? En otras palabras, ¿por qué una célula transcribe todos estos diversos tipos de secuencias de DNA? No se conoce la respuesta a esta pregunta básica. Según un punto de vista, gran parte de esta actividad de transcripción dominante es simplemente el "ruido de fondo" que acompaña al complejo proceso de expresión génica. Los defensores de este punto de vista citan los resultados de estudios en ratones en los que se han eliminado bloques del genoma que carecen de genes que codifican proteínas. Se descubrió en estos estudios que los ratones sanos pueden desarrollarse a pesar de que no pueden sintetizar el tamaño de los RNA no codificantes (*ncRNA*) que normalmente se habrían producido a partir de las secuencias de DNA eliminadas. Según otro punto de vista contradictorio, gran parte del RNA no codificante que se está produciendo está involucrado en diversas actividades regulatorias que aún no se han identificado. Los partidarios de esta posición citan resultados que sugieren que esta transcripción dominante no es aleatoria; muchos de los transcriptos no codificadores exhiben patrones distintos y reproducibles de distribución específica de tejidos, y su origen se puede remontar a *loci* específicos en el genoma. Tenga en cuenta que sólo en la última década han salido a la luz la existencia de siRNA, miRNA y piRNA, y es probable que otros tipos de ncRNA pequeños permanezcan sin detectar. No todas las transcripciones no codificadas son pequeñas. Una cantidad de largos ncRNA (>200 bases) conservados evolutivamente (p. ej., *XIST, HOTAIR* y *AIRE*), que funcionan como reguladores de la estructura de la cromatina o de la transcripción génica también se han descubierto, como se discute en las secciones 12.4 y 12.17, respectivamente. Los estudios genómicos muestran que hay miles de ncRNA largos conservados (lncRNA, *conserved long ncRNA*), y los pocos cuyas funciones biológicas se han identificado son sólo la punta del iceberg. Incluso es posible que la gran producción transcripcional del genoma de los mamíferos tenga la clave para explicar por qué tenemos aproximadamente el mismo número de genes que los organismos que creemos que son mucho menos complejos (véase figura 10-28). Con independencia de la explicación real, un punto es claro: hay muchas cosas que no entendemos acerca de los muchos roles de los RNA en las células eucarióticas.

**REPASO**

1. Compare y confronte el CRISPR RNA con el piRNA, en términos de cómo se produce el RNA y con qué proteínas se asocian.
2. ¿Por qué la capacidad del sistema CRISPR para cortar el DNA es tan útil para los investigadores? ¿Por qué no se puede usar el RNAi para el mismo propósito?

## 11.14 Codificación de la información genética

Una vez revelada la estructura del DNA en 1953, se hizo evidente que la secuencia de nucleótidos en el DNA de un gen especificaba la secuencia de aminoácidos en un polipéptido. Parecía muy poco probable que el DNA pudiera servir como una plantilla física directa para el ensamblaje de una proteína. En cambio, se presumió que la información almacenada en la secuencia de nucleótidos estaba presente en algún tipo de **código genético**. Con el descubrimiento del RNA mensajero como intermediario en el flujo de información desde el DNA hasta la proteína, la atención se centró en la forma en que una secuencia escrita en un "alfabeto" ribonucleótido podría codificar una secuencia en un "alfabeto" que consistía en aminoácidos.

### Las propiedades del código genético

Uno de los primeros modelos del código genético fue presentado por el físico George Gamow, quien propuso que cada aminoácido en un polipéptido estaba codificado por tres nucleótidos secuenciales. Dicho de otra forma, las palabras del código, o **codones**, eran tripletas de nucleótidos en los aminoácidos. Gamow llegó a esta conclusión con un poco de lógica de sillón. Infirió que *requeriría* al menos tres nucleótidos para que cada aminoácido tuviera su propio codón único. Considérese la cantidad de palabras que se pueden escribir usando un alfabeto que contiene cuatro letras diferentes, que corresponden a las cuatro posibles bases que pueden estar presentes en un sitio particular en el DNA (o mRNA). Hay cuatro posibles palabras de una letra, 16 ($4^2$) palabras posibles de dos letras y 64 ($4^3$) palabras posibles de tres letras. Debido a que hay 20 aminoácidos diferentes (palabras) que deben especificarse, los codones deben contener al menos tres nucleótidos sucesivos (letras). Pronto se verificó la naturaleza trilliza del código en una serie de perspicaces experimentos genéticos que realizaron Francis Crick, Sydney Brenner y sus colegas de la Universidad de Cambridge.[6]

Además de proponer que el código era triplete, Gamow también sugirió que era *solapante*. A pesar de que esta sugerencia resultó ser incorrecta, planteaba una pregunta interesante sobre

[6] Aquel que busque leer un breve trabajo de investigación que transmita una sensación del poder inductivo y la elegancia de los estudios pioneros en genética molecular puede encontrar estos experimentos sobre el código genético en *Nature* 1961;192:1227. (Véase *Cell* 2007;128:815, para la discusión de este experimento clásico.)

el código genético. Considérese la siguiente secuencia de nucleótidos:

—AGCAUCGCAUCGA—

Si el código es *solapante*, entonces el ribosoma moverá a lo largo del mRNA un nucleótido a la vez y reconocerá un nuevo codón con cada movimiento. En la secuencia anterior, AGC especificaría un aminoácido, GCA especificaría el siguiente aminoácido, CAU el siguiente, y así sucesivamente. Por el contrario, si el código es *no solapante*, cada nucleótido a lo largo del mRNA sería parte de un codón, y sólo uno. En la secuencia anterior, AGC, AUC y GCA especificarían aminoácidos sucesivos.

Una conclusión sobre si el código genético era solapante o no solapante podría inferirse a partir de estudios de proteínas mutantes, como la hemoglobina mutante responsable de la anemia de células falciformes. En la anemia de células falciformes, como en la mayoría de los otros casos que se estudiaron, se descubrió que la proteína mutante contiene una única sustitución de aminoácidos. Si el código se superpone, se esperaría que un cambio en uno de los pares de bases en el DNA afectara a tres codones consecutivos (consúltese **FIGURA 11-37**), y por tanto a tres aminoácidos consecutivos en el polipéptido correspondiente. Sin embargo, si el código no solapa y cada nucleótido es parte de un único codón, entonces sólo se esperaría el reemplazo de un aminoácido. Estos y otros datos indicaron que el código es no solapante.

Dado un código triplete que puede especificar 64 aminoácidos diferentes, y la realidad de que sólo hay 20 aminoácidos por especificar, surge la pregunta sobre la función de los 44 tripletes adicionales. Si alguno o todos estos 44 tripletes codifican aminoácidos, al menos algunos de los aminoácidos estarían especificados por más de un codón. Se dice que un código de este tipo es *degenerado*. Como resultado, el código es altamente degenerado, ya que casi todos los 64 posibles codones especifican aminoácidos. Aquellos que no lo hacen (tres de los 64) tienen una función especial de "puntuacion" —son reconocidos por el ribosoma como codones de terminación, y hacen que la lectura del mensaje se detenga—.

## Identificación de codones

En 1961, se conocían las propiedades generales del código, pero no se había descubierto una de las asignaciones de codificación de los tripletes específicos. En ese momento la mayoría de los genetistas pensaban que tomaría muchos años descifrar todo el código. Pero Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei hicieron un gran avance, ya que usaron una enzima polinucleótido fosforilasa para sintetizar sus propios mensajes genéticos artificiales, y después determinar qué tipo de proteína codificaban. El primer mensaje que probaron fue un polirribonucleótido que consiste exclusivamente en uridina; el mensaje se llamó *poli(U)*. Cuando se añadió poli(U) a un tubo de ensayo que contenía un extracto bacteriano con los 20 aminoácidos y los materiales necesarios para la síntesis de proteínas (ribosomas y diversos factores solubles), el sistema siguió las instrucciones del mensajero artificial y fabricó un polipéptido. El polipéptido ensamblado se analizó y se encontró que era polifenilalanina —un polímero del aminoácido fenilalanina—. Nirenberg y Matthaei habían demostrado que el codón UUU especifica la fenilalanina.

Durante los siguientes cuatro años varios laboratorios se unieron a la persecución y se construyeron mRNA sintéticos para probar las especificaciones de aminoácidos para los 64 posibles codones. El resultado fue el gráfico del decodificador universal para el código genético que se muestra en la **FIGURA 11-38**. El gráfico del decodificador enumera la secuencia de nucleótidos para cada uno de los 64 posibles codones en un mRNA. Las instrucciones para leer la tabla se proporcionan en la leyenda de la figura 11-38.[7]

Las primeras excepciones a las asignaciones de los codones que se muestran en la figura 11-38 se encontraron en mRNA mitocondriales. Por ejemplo, en las mitocondrias humanas UGA se lee como triptófano en lugar de 'pare', AUA se lee como metionina en lugar de isoleucina, y AGA y AGG se leen como 'pare' en lugar de arginina. Más recientemente se han encontrado excepciones, aquí y allá, en los codones de DNA nuclear de protistas y hongos. Sin embargo, es evidente que estas pequeñas desviaciones han evolucionado como cambios secundarios del código genético estándar, y que el código genético que se muestra en la figura 11-38 puede considerarse universal; es decir, está presente en todos los organismos. Podemos concluir además que todos los organismos conocidos presentes en la Tierra comparten hoy un origen evolutivo común.

El examen del diagrama de codones en la figura 11-38 indica que las asignaciones de aminoácidos son claramente no aleatorias. Si se buscan las casillas de codones para un aminoácido específico, se verá que tienden a agruparse dentro de una porción particular de la tabla. La agrupación refleja la similitud en los codones que especifican el mismo aminoácido. Como resultado de esta similitud en la secuencia del codón, las mutaciones espontáneas que causan cambios de bases únicos en un gen a menudo no producirán un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente. Se dice que un cambio en la secuencia de nucleótidos que no afecta a la secuencia de aminoácidos es *sinónimo*, mientras que un cambio que causa una sustitución de aminoácidos se dice que es *no sinónimo*. Estos dos tipos de mutaciones se representan en la **FIGURA 11-39**, que describe varios de los diferentes tipos de mutaciones discutidas en este capítulo. Los cambios sinónimos (figura 11-39*a*) son mucho menos propensos a cambiar el fenotipo de un organismo que los cambios no sinó-

[7] Como se describe en la página 442, los ribosomas siempre identifican un AUG como el codón para iniciar la síntesis de los polipéptidos. En estos primeros experimentos con polinucleótidos sintéticos, los pasos que utilizan extractos bacterianos para sintetizar polipéptidos se llevaron a cabo a concentraciones de $Mg^{2+}$ inusualmente altas, lo que permitió que el ribosoma iniciara la traducción en cualquier codón.

| Secuencia base | Codones | |
|---|---|---|
| Secuencia original<br>. . . AGCATCG . . . | Código solapante<br>. . ., AGC GCA CAT ATC TCG . . . | Código no solapante<br>. . ., AGC ATC . . . |
| Secuencia después de la sustitución de una sola base<br>. . . AGAATCG . . . | Código solapante<br>. . ., <u>AGA</u> <u>GAA</u> <u>AAT</u> ATC TCG . . . | Código no solapante<br>. . ., <u>AGA</u> ATC . . . |

**FIGURA 11-37 La distinción entre un código genético solapante y otro no solapante.** El efecto sobre el contenido de información de un mRNA por una única sustitución de base, en dependencia de si el código es solapante o no solapante. Los codones afectados están subrayados en rojo.

| 1a. letra | 2a. letra: U | C | A | G | 3a. letra |
|---|---|---|---|---|---|
| U | PhenylAlanina | Serina | Tirosina | Cisteína | U |
| U | PhenylAlanina | Serina | Tirosina | Cisteína | C |
| U | Leucina | Serina | Pare | Pare | A |
| U | Leucina | Serina | Pare | Triptófano | G |
| C | Leucina | Prolina | Histidina | Arginina | U |
| C | Leucina | Prolina | Histidina | Arginina | C |
| C | Leucina | Prolina | Glutamina | Arginina | A |
| C | Leucina | Prolina | Glutamina | Arginina | G |
| A | IsoLeucina | Treonina | Asparagina | Serina | U |
| A | IsoLeucina | Treonina | Asparagina | Serina | C |
| A | IsoLeucina | Treonina | Lisina | Arginina | A |
| A | (Inicio) Metionina | Treonina | Lisina | Arginina | G |
| G | Valina | Alanina | Ácido aspártico | Glicina | U |
| G | Valina | Alanina | Ácido aspártico | Glicina | C |
| G | Valina | Alanina | Ácido glutámico | Glicina | A |
| G | Valina | Alanina | Ácido glutámico | Glicina | G |

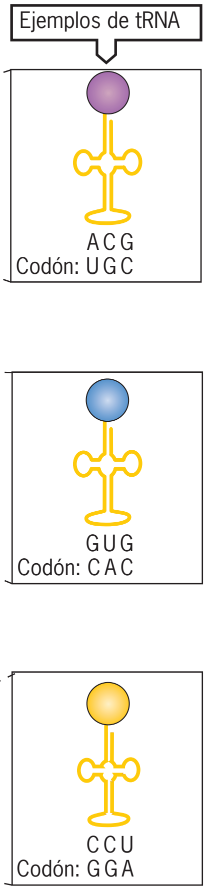



**FIGURA 11-38 Código genético.** Este gráfico decodificador universal enumera cada uno de los 64 posibles codones del mRNA y el aminoácido correspondiente especificado por ese codón. Para usar el gráfico para traducir el codón UGC, por ejemplo, encuentre la primera letra (U) en la fila indicada a la izquierda. Siga esa fila a la derecha hasta llegar a la segunda letra (G) indicada en la parte superior; luego encuentre el aminoácido que coincide con la tercera letra (C) en la fila de la derecha. La UGC especifica la inserción de cisteína. Cada aminoácido (excepto dos) tiene dos o más codones que ordenan su inserción, lo que hace que el código se degenere. Un aminoácido dado tiende a estar codificado por codones relacionados. Esta característica reduce la probabilidad de que las sustituciones de bases produzcan cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína. Los aminoácidos con propiedades similares también tienden a agruparse. Los aminoácidos con hebras laterales ácidas se muestran en rojo, aquellos con hebras laterales básicas en azul, aquellos con hebras laterales no cargadas en verde, y aquellos con hebras laterales hidrofóbicas en marrón. Como se trata en la siguiente sección, la decodificación en la célula se lleva a cabo mediante las tRNA, algunas de los cuales se ilustran esquemáticamente en el lado derecho de la figura. UAA, UAG y UGA se leen como codones de parada.

**Secuencia base de RNA**

Secuencia original

. . . AGC AUC UGU . . .

Secuencia después de la sustitución de una sola base

*a)* . . . AGC AUA UGU . . . Mutación sinónima

*b)* . . . AGC AUG UGU . . . Mutación no sinónima

*c)* . . . AGC AUC UGA . . . Mutación sin sentido

Secuencias después de la inserción o deleción de una o dos bases

*d)* . . . AGC CAU CUG U . . . . Mutaciones de cambio de marco

. . . AGU GCA UCU GU. . . .

. . . AGC UCU GU . . . . . .

. . . AGC CUG U . . . . . . .

**FIGURA 11-39 Los genes pueden estar sujetos a varios tipos de mutaciones.** Las líneas rojas denotan codones. *a*) Mutaciones sinónimas (en este caso, AUC a AUA) no afectan a una asignación codificante de aminoácidos, pero aún pueden tener un efecto fenotípico al alterar los eventos de corte y empalme pre-mRNA, la eficacia de traducción, la estabilidad del mRNA, etcétera. *b*) Las mutaciones no sinónimas (o de cambio de sentido) (en este caso, AUC a AUG) provocan un cambio de un solo aminoácido en la secuencia polipeptídica. *c*) Las mutaciones sin sentido (o codones de terminación prematura) (en este caso UGU a UGA) hacen que el ribosoma deje de traducir el mRNA en el sitio de la mutación, lo que termina la síntesis de proteína de forma prematura. *d*) Las mutaciones de cambio de marco, que pueden ser causadas por la inserción o eliminación de una o dos bases, mueven el ribosoma en un marco de lectura incorrecto, causando una secuencia de aminoácidos anormal desde el punto de mutación hacia adelante.

nimos (véase figura 11-39*b*). En consecuencia, es mucho más probable que los cambios no sinónimos sean seleccionados a favor o en contra por selección natural. Ahora que hemos secuenciado los genomas de organismos relacionados, como los de chimpancés y humanos, podemos observar directamente las secuencias de genes homólogos y ver cuántos cambios son sinónimos o no sinónimos. Es probable que los genes que poseen un exceso de sustituciones no sinónimas en sus regiones codificadoras hayan sido influidos por la selección natural (véase la nota a pie de página en la página 396).

El aspecto de "salvaguardia" del código va más allá de su degeneración. Las asignaciones de codones son tales que los aminoácidos similares tienden a ser especificados por codones similares. Por ejemplo, los codones de los diversos aminoácidos hidrofóbicos (representados como cuadros marrones en la figura 11-38) están agrupados en las dos primeras columnas de la tabla. Por consiguiente, es probable que una mutación que da como resultado una sustitución de bases en uno de estos codones sustituya un residuo hidrófobo por otro. Además, las mayores similitudes entre los codones relacionados con aminoácidos se producen en los dos primeros nucleótidos del triplete, mientras que la mayor variabilidad se produce en el tercer nucleótido. Por ejemplo, la glicina está codificada por cuatro codones, de los cuales todos comienzan con los nucleótidos GG. Una explicación para este fenómeno se revela en la siguiente sección en la que se describe el papel de los RNA de transferencia.

## REPASO

1. Explica qué significa declarar que el código genético es triplete y no solapante? ¿Qué sugiere el código genético sobre el hallazgo de que las composiciones de bases de DNA varían mucho entre diferentes organismos? ¿Cómo se estableció la identidad del codón UUU?
2. Distinga entre los efectos de una sustitución de base en el DNA en un código no solapante y uno solapante.
3. Distinga entre un cambio de base sinónimo y otro no sinónimo.

# 11.15 Decodificación de codones: el papel de los RNA de transferencia

Los ácidos nucleicos y las proteínas son como dos idiomas escritos con diferentes tipos de letras. Esta es la razón por la cual la síntesis de proteínas se denomina *traducción*. La traducción requiere que la información codificada en la secuencia de nucleótidos de un mRNA se decodifique, y se use para dirigir el ensamblaje secuencial de aminoácidos en una cadena polipeptídica. La decodificación de la información en un mRNA se lleva a cabo mediante RNA de transferencia (transfer RNA), que actúan como adaptadores. Por un lado, cada tRNA está unido a un aminoácido específico (como un aa-tRNA), mientras que, por otro lado, ese mismo tRNA es capaz de reconocer un codón particular en el mRNA. La interacción entre los codones sucesivos en el mRNA y los aa-tRNA específicos conduce a la síntesis de un polipéptido con una secuencia ordenada de aminoácidos. Para entender cómo ocurre esto, primero debemos considerar la estructura del tRNA.

## Estructura del tRNA

En 1965, tras siete años de trabajo, Robert Holley de la Universidad de Cornell informó la primera secuencia de bases de una molécula de RNA, la de un RNA de transferencia de levadura que porta el aminoácido alanina (consúltese **FIGURA 11-40*a***). Este tRNA está compuesto por 77 nucleótidos, 10 de los cuales están modificados a partir de los cuatro nucleótidos estándar del RNA (A, G, C, U), como lo indica el sombreado de la figura.

Durante los años siguientes otras especies de tRNA se purificaron y secuenciaron, y se hicieron evidentes varias similitudes en todos los tRNA diferentes (obsérvese figura 11-40*b*). Todos los tRNA tenían aproximadamente la misma longitud, entre 73 y 93 nucleótidos, y todos tenían un porcentaje significativo de bases inusuales que se encontraron como resultado de modificaciones enzimáticas de una de las cuatro bases estándar, después de que se había incorporado a la cadena de RNA; es decir, postranscripcionalmente. Además, todos los tRNA tenían secuencias de nu-

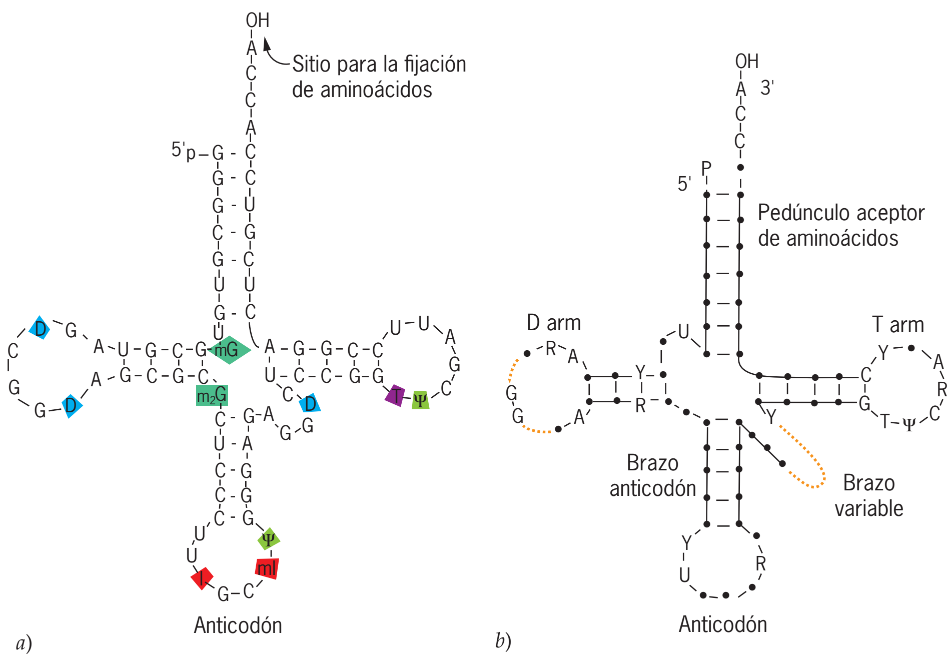


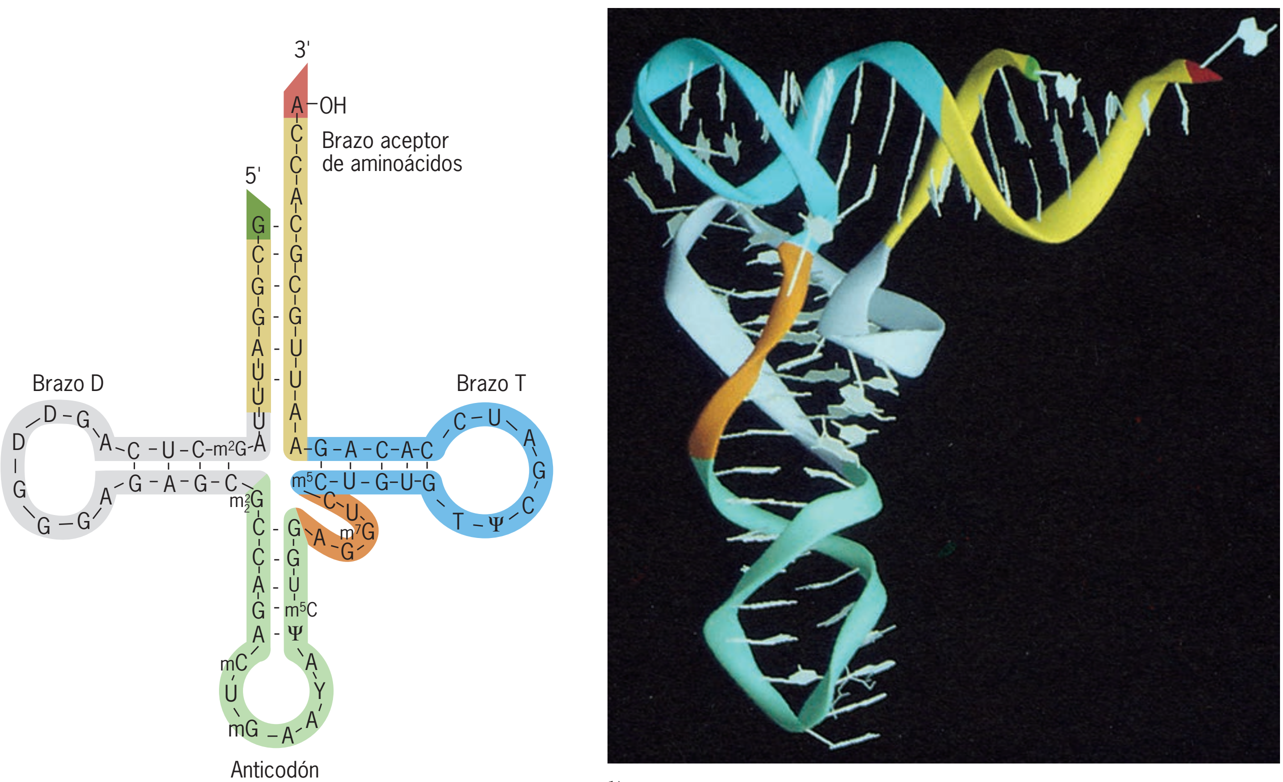

**FIGURA 11-40 Estructura bidimensional de los RNA de transferencia.** *a*) Secuencia de nucleótidos en forma de hoja de trébol de una levadura $tRNA^{Ala}$. El aminoácido se une al extremo 3′ del tRNA, mientras que el extremo opuesto contiene el anticodón, en este caso IGC. La función del anticodón se discute más adelante. Además de las cuatro bases, A, U, G y C, este tRNA contiene ψ, pseudouridina (véase figura 11-13*a*); T, ribotimidina; mI, metil inosina; I, inosina; $me_2G$, dimetilguanosina; D, dihidrouridina; y meG, metilguanosina. Los sitios de las 10 bases modificadas en este tRNA están indicados por el sombreado de color. *b*) Representación generalizada del tRNA en forma de hoja de trébol. Las bases comunes a todos los tRNA (tanto procariotas como eucariotas) están indicadas por letras; R es una purina invariable, Y es una pirimidina invariable, Ψ es una pseudouridina invariable. La mayor variabilidad entre tRNA se produce en el brazo V (variable), que puede oscilar entre 4 y 21 nucleótidos. Hay dos sitios de variabilidad menor en la longitud del brazo D.

cleótidos en una parte de la molécula que eran complementarias a las secuencias ubicadas en otras partes de la molécula. Debido a estas secuencias complementarias, los diversos tRNA se pliegan de forma similar para formar una estructura que se puede dibujar en dos dimensiones como una hoja de trébol. Los pedúnculos emparejados por bases y los lazos no apareados de la hoja de trébol de tRNA se muestran en las figuras 11-42 y 11-43. Las bases inusuales, que se concentran en los lazos, interrumpen la formación de enlaces de hidrógeno en estas regiones y sirven como posibles sitios de reconocimiento para diversas proteínas. Todos los tRNA maduros tienen la secuencia triple CCA en su extremo 3′. Estos tres nucleótidos pueden estar codificados en el gen tRNA (en muchas procariotas) o pueden agregarse enzimáticamente (en las eucariotas). En el último caso, una única enzima talentosa, conocida como enzima aditiva CCA, agrega los tres nucleótidos en el orden correcto sin el beneficio de una plantilla de DNA o RNA.

Hasta este punto, hemos considerado sólo la estructura secundaria o bidimensional de estas moléculas adaptadoras. Los RNA de transferencia se pliegan en una estructura terciaria única y definida. El análisis por difracción de rayos X ha demostrado que los tRNA se construyen a partir de dos hélices dobles dispuestas en forma de L (véase **FIGURA 11-41*b***). Aquellas bases que se encuentran en sitios comparables en todas las moléculas de tRNA (las bases *invariantes* de la figura 11.40*b*) son particularmente importantes en la generación de la estructura terciaria en forma de L. Las formas comunes de RNA reflejan el hecho de que todos ellos participan en una serie similar de reacciones durante la síntesis de proteínas. Sin embargo, cada tRNA tiene características únicas que lo distinguen de otros tRNA. Como se analiza en la siguiente sección, son estas características únicas las que hacen posible que un aminoácido se una enzimáticamente al tRNA apropiado (afín).

Los RNA de transferencia traducen una secuencia de codones de mRNA a una secuencia de residuos de aminoácidos. La información contenida en el mRNA se decodifica a través de la formación de pares de bases entre secuencias complementarias en los RNA de transferencia y mensajero (véase figura 11-47). Por tanto, como con otros procesos que implican ácidos nucleicos, la complementariedad entre los pares de bases se encuentra en el corazón del proceso de traducción. La parte del tRNA que participa en esta interacción complementaria con el codón del mRNA es un tramo de tres nucleótidos secuenciales, llamado **anticodón**, que está situado en el lazo medio de la molécula de tRNA (obsérvese figura 11-41*a*). Este ciclo está compuesto invariablemente por siete nucleótidos, los tres intermedios constituyen el anticodón. El anticodón se encuentra en un extremo de la molécula de tRNA en forma de L, opuesta al extremo al que está unido el aminoácido (véase figura 11-41*b*).

Dado el hecho de que 61 codones diferentes pueden especificar un aminoácido, se puede esperar que una célula tenga al menos 61 tRNA diferentes, cada uno con un anticodón diferente de uno de los codones de la figura 11-38. Pero hay que recordar que las mayores similitudes entre los codones que especifican el mismo aminoácido se producen en los dos primeros nucleótidos del triplete, mientras que la mayor variabilidad en estos mismos codones se produce en el tercer nucleótido del triplete. Considérense los 16 codones que terminan en U. En todos los casos si la U se cambia a C, se especifica el mismo aminoácido (las dos primeras líneas de cada recuadro en la figura 11-38). De manera similar, en la mayoría de los casos un cambio entre un A y un G en el tercer sitio tampoco tiene efecto sobre la determinación de aminoácidos. La intercambiabilidad de la base de la tercera posición llevó a Francis Crick a proponer que el mismo RNA de transferencia pueda reconocer más de un codón. Su propuesta, denominada la *hipótesis de oscilación*, sugirió que el requisito estérico entre el anticodón del tRNA y el codón del mRNA es muy estricto para las dos primeras posiciones, pero es más flexible en la tercera posi-




*a*) *b*)

**FIGURA 11-41** La estructura de un tRNA. *a*) Estructura bidimensional de un fenilalanil-tRNA de levadura con las diversas regiones de la molécula codificadas por colores para que coincida con la parte b. *b*) Estructura tridimensional de $tRNA^{Phe}$ derivada de la cristalografía de rayos X. El brazo aceptor de aminoácidos (AA) y el brazo TψC (T) forman una doble hélice continua, y el brazo anticodón (AC) y el brazo D forman una doble hélice parcialmente continua. Estas dos columnas helicoidales se unen para formar una molécula en forma de L.

FUENTE: Cortesía de Michael Carson, Universidad de Alabama en Birmingham.

ción. Como resultado, dos codones que especifican el mismo aminoácido y difieren sólo en la tercera posición deberían usar el mismo tRNA en la síntesis de proteínas. Una vez más una hipótesis de Crick demostró ser correcta.

Las reglas que gobiernan la oscilación en la tercera posición del codón son las siguientes (consúltese **FIGURA 11-42**): la U del anticodón puede emparejarse con la A o G del mRNA; la G del anticodón puede emparejarse con la U o C del mRNA; y la I (inosina, que se deriva de la guanina en la molécula de tRNA original) del anticodón se puede emparejar con la U, C o A del mRNA. Como resultado de la oscilación, los seis codones para la leucina, por ejemplo, requieren sólo tres tRNA.

## Carga del tRNA

Es críticamente importante durante la síntesis de polipéptidos que cada molécula de RNA de transferencia se una al aminoácido correcto (afín), un proceso conocido como *carga de tRNA*. Los aminoácidos están unidos en forma covalente a los extremos 3′ de sus tRNA afines por una enzima llamada **aminoacil-tRNA sintetasa (aaRS, *aminoacyl-tRNA synthetase*)** (véase **FIGURA 11-43**). Aunque hay muchas excepciones, los organismos típicamente contienen 20 aminoacil-tRNA sintetasas diferentes, una para cada uno de los 20 aminoácidos incorporados en las proteínas. Cada una de las sintetasas es capaz de cargar todos los tRNA que son apropiados para ese aminoácido (es decir, cualquier tRNA cuyo anticodón reconozca uno de los diversos codones que especifican ese aminoácido, como se indica en la figura 11-38). Las aminoacil-tRNA sintetasas proporcionan un excelente ejemplo de la especificidad de las interacciones proteína-ácido nucleico. Deben existir ciertas características comunes entre todas las especies de tRNA que especifiquen un aminoácido determinado para permitir que una única aminoacil-tRNA sintetasa reconozca todos estos tRNA, y al mismo tiempo discrimine todos los demás tRNA de otros aminoácidos. La información sobre las características estructurales de los tRNA que hacen que sean seleccionados o rechazados como sustratos provienen principalmente de dos fuentes:

1. Determinación de la estructura tridimensional de estas enzimas mediante cristalografía de rayos X, que permite a los investigadores identificar qué sitios en el tRNA hacen contacto directo con la proteína. Como se ilustra en la figura 11-43, los dos extremos del tRNA –el vástago aceptor y el anticodón– son en particular importantes para el reconocimiento por la mayoría de estas enzimas.
2. Determinación de los cambios en un tRNA que causan que la molécula sea aminoacilada por una sintetasa no codificada. Se encuentra, por ejemplo, que un par específico de bases en un $tRNA^{Ala}$ (el par de bases G-U que implica el tercer G del extremo 5′ de la molécula en la figura 11-40*a*) es el principal determinante de su interacción con la alanil-TRNA sintetasa. La inserción de este par específico de bases en el tronco aceptor de un $tRNA^{Phe}$ o un $tRNA^{Cys}$ es suficiente para hacer que estos tRNA sean reconocidos por la alanil-tRNA sintetasa y sean aminoacilados con la alanina.

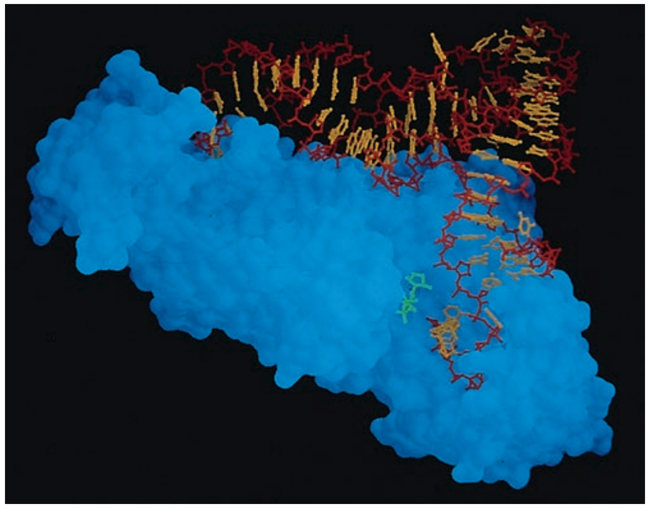


**FIGURA 11-43 Retrato tridimensional de la interacción entre un tRNA y su aminoacil-tRNA sintetasa.** La estructura cristalina de *E. coli* glutaminil-tRNA sintetasa (en azul) formó un complejo con tRNAGln (en rojo y amarillo). La enzima reconoce este tRNA específico y discrimina a otros a través de interacciones con el vástago aceptor y el anticodón del tRNA.

FUENTE: Tomado de Thomas A. Steitz, *Science* 1989; vol. 246, cubierta del ejemplar 12/1/89; reimpreso con permiso de AAAS.

Las aminoacil-tRNA sintetasas llevan a cabo la siguiente reacción de dos etapas:

1er. paso: ATP + aminoácido → aminoacil-AMP + PPi

2o. paso: aminoacil-AMP + tRNA → aminoacil-tRNA + AMP

En el primer paso, la energía del ATP activa el aminoácido mediante la formación de un aminoácido adenilado, que se une a la enzima. Este es el paso primario que requiere energía en las reacciones químicas que conducen a la síntesis de polipéptidos. Los sucesos posteriores, tales como la transferencia del aminoácido a la molécula de tRNA (paso 2 anterior), y con el tiempo a la hebra polipeptídica en crecimiento, son termodinámicamente favorables. El PPi producido en la primera reacción se hidroliza posteriormente a Pi, impulsando aún más la reacción general hacia la formación de los productos (página 408). Como veremos más adelante, se gasta energía durante la síntesis de proteínas, pero no se usa en la formación de enlaces peptídicos. En el segundo paso, la enzima transfiere su aminoácido unido al extremo 3′ de un tRNA afín.

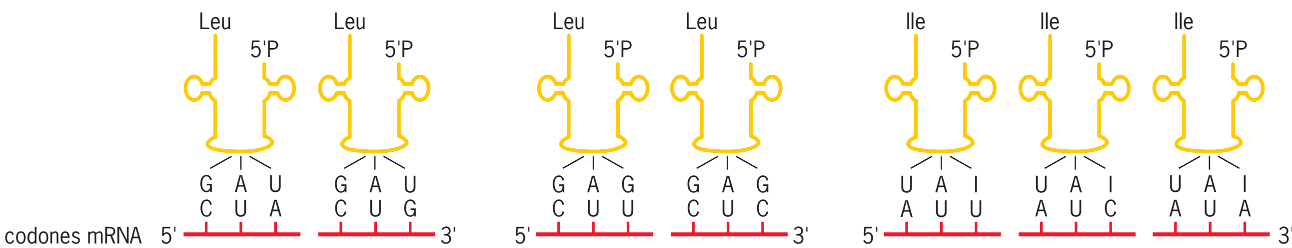



**FIGURA 11-42 Oscilación en la interacción entre codones y anticodones.** En algunos casos el nucleótido en el extremo 5′ del anticodón de tRNA es capaz de aparearse con más de un nucleótido en el extremo 3′ (tercera posición) del codón de mRNA. En consecuencia, más de un codón puede usar el mismo tRNA. Las reglas para el emparejamiento en el esquema de oscilación se indican en la figura y en el texto.

Entre los 20 aminoácidos incorporados en las proteínas, algunos son bastante similares a otros en su estructura. Las sintetasas que catalizan reacciones que tratan con estos aminoácidos "de apariencia similar" poseen un segundo sitio de edición además del sitio catalítico. Si ocurriera que la sintetasa coloca un aminoácido inapropiado en el sitio catalítico del tRNA, se activa un mecanismo de corrección de pruebas de la enzima, y el enlace entre el aminoácido y el tRNA se corta en el sitio de edición.

Se han desarrollado varios métodos que permiten a los investigadores sintetizar proteínas —ya sea en el tubo de ensayo o dentro de las células— que contienen aminoácidos no naturales; es decir, aminoácidos distintos de los 20 normalmente incorporados por la maquinaria de traducción. Estos aminoácidos no análogos no se generan por modificación de aminoácidos normales después de su incorporación en el polipéptido, sino que están codificados directamente dentro del mRNA. Esta "expansión" del código genético por lo general implica el uso de un tRNA modificado por vía experimental, que reconoce uno de los codones de parada y una aminoacil-tRNA sintetasa afín que reconoce específicamente el aminoácido no natural. A continuación el aminoácido no natural se incorpora en la cadena polipéptidica dondequiera que encuentre un codón de parada particular dentro de un mRNA. Mediante el uso de estos métodos los investigadores pueden sintetizar una proteína conteniendo grupos químicos capaces de informar sobre las actividades de la proteína, o pueden diseñar proteínas con estructuras y funciones novedosas para el uso como posibles fármacos u otras aplicaciones comerciales.

**REPASO**

1. ¿Por qué los tRNA se denominan moléculas adaptadoras? ¿Qué aspectos de su estructura tienen los tRNA en común?
2. Describa la naturaleza de la interacción entre tRNA y aminoacil-tRNA sintetasas. Describa la naturaleza de la interacción entre tRNA y mRNA. ¿Cuál es la hipótesis de la oscilación?

## 11.16 Traducción de información genética: inicio

La síntesis de proteínas, o *traducción*, puede ser la actividad de síntesis más compleja en una célula. El ensamblaje de una proteína requiere todos los diversos tRNA con sus adjuntos aminoácidos, ribosomas, un RNA mensajero, numerosas proteínas con diferentes funciones, cationes, y GTP. La complejidad no es sorprendente si se considera que la síntesis de proteínas requiere la incorporación de 20 aminoácidos diferentes en la secuencia precisa dictada por un mensaje cifrado, escrito en un lenguaje que usa caracteres diferentes. En la discusión siguiente descansaremos con mayor peso en los mecanismos de traducción mientras operan en células bacterianas, que es el más simple y mejor entendido. El proceso es notablemente similar en las células eucarióticas. La síntesis de una cadena de polipéptido se puede dividir en tres actividades bastante diferentes: *inicio* de la cadena, *elongación* de la cadena, y *terminación* de la cadena.

Una vez que se une un mRNA, un ribosoma siempre se mueve a lo largo del mRNA de un codón al siguiente; es decir en bloques consecutivos de tres nucleótidos. Para asegurar que se lean los tripletes apropiados, el ribosoma se enlaza al mRNA en un sitio preciso, llamado el **codón de inicio**, que se especifica como AUG. La vinculación a este codón coloca automáticamente el ribosoma en el **marco de lectura** adecuado para que lea correctamente el mensaje completo a partir de ese momento. Por ejemplo, en el siguiente caso,

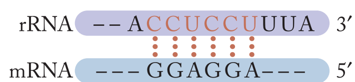
—CUAGUUACAUGCUCCAGUCCGU—

el ribosoma se mueve desde el codón de inicio, AUG, a los siguientes tres nucleótidos, CUC, luego a CAG, y así sucesivamente a lo largo de toda la línea.

### Inicio de la traducción en las procariotas

Los pasos básicos para iniciar la traducción en células bacterianas se ilustran en la **FIGURA 11-44**.

**PASO 1 DEL INICIO: TRAER LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL PEQUEÑA AL CODÓN DE INICIO** Como se ve en la figura 11-44, un mRNA no se une a un ribosoma intacto, sino a las subunidades pequeñas y grandes en etapas separadas. El primer paso de inicio importante es la unión de la subunidad ribosomal pequeña a la primera secuencia AUG (o una de las primeras) en el mensaje, que sirve como codón de inicio.[8] ¿Cómo selecciona la subunidad pequeña el codón AUG inicial como opuesto a alguno interno? Los mRNA bacterianos poseen una secuencia específica de nucleótidos (llamada secuencia de Shine-Dalgarno tras sus descubridores) que alberga de cinco a 10 nucleótidos antes del codón de inicio. La secuencia de Shine-Dalgarno es complementaria a una secuencia de nucleótidos cerca del extremo 3′ del RNA ribosómico 16S de la subunidad ribosomal pequeña.




La interacción entre estas secuencias complementarias en mRNA y rRNA coloca la subunidad 30S en el codón de inicio AUG.

Varios de los pasos descritos en la figura 11-44 requieren la ayuda de proteínas solubles, llamadas **factores de inicio** (designados como IFs en las bacterias y eIFs en las eucariotas). Las células bacterianas requieren tres factores de inicio, IF1, IF2 e IF3, que se unen a la subunidad 30S (paso 1, véase figura 11-44). El IF2 es una proteína de unión al GTP requerida para la unión del primer aminoacil-tRNA. El IF3 puede evitar que la unidad secundaria grande (50S) se una prematuramente a la subunidad 30S, y también facilitar la entrada del iniciador apropiado aa-tRNA. El IF1 estabiliza la unión de la subunidad 30S al mRNA, y evita que el iniciador aa-tRNA ingrese al sitio equivocado en el ribosoma.

**PASO 2 DEL INICIO: TRAER EL PRIMER aa-tRNA HACIA EL RIBOSOMA** Si se examinan las asignaciones de codones (consúltese figura 11-38), se puede ver que AUG es más que un codón de inicio; también es el único codón para la metionina. De hecho, la metionina es siempre el primer aminoácido que se incorpora en el extremo N de una hebra del polipéptido naciente. (En las bacterias, la metionina inicial contiene un grupo formilo, lo que la convierte en *N*-formilmetionina). La metionina (o *N*-formilmetionina) se elimina con posterioridad por vía enzimática de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas. Las células poseen dos metionil-tRNA distintos: uno se utiliza para iniciar la síntesis de proteínas, y otro diferente para incorporar residuos de metionilo en el interior de un polipéptido. El iniciador aa-tRNA se posiciona mediante el factor de inicio IF2 dentro del sitio P del ribosoma (paso 2, véase figura 11-44), donde el lazo anticodón del tRNA se enlaza al codón AUG del mRNA. Los IF1 e IF3 son liberados.

[8] El GUG también es capaz de servir como un codón de inicio, y se encuentra como tal en unos pocos mensajes naturales. Cuando se usa GUG la *N*-formilmetionina se sigue utilizando para formar el complejo de inicio, a pesar del hecho de que los codones GUG internos especifican la valina.

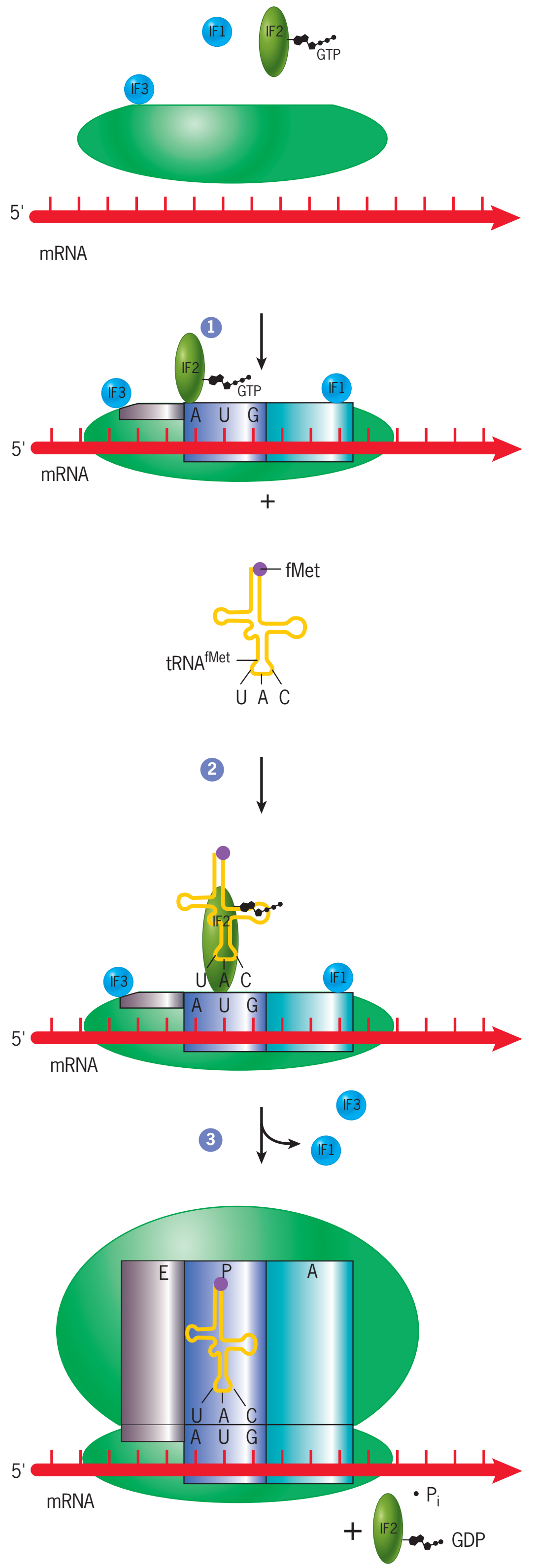



**FIGURA 11-44 Inicio de la síntesis de proteínas en bacterias.** En el paso 1 el inicio de la traducción comienza con la asociación de la subunidad ribosomal 30S con el mRNA en el codón de inicio AUG, un paso que requiere del IF1 e IF3. La subunidad ribosomal 30S se une al mRNA en el codón de inicio AUG como resultado de una interacción entre una secuencia de nucleótidos complementaria en el rRNA y mRNA, como se analiza en el texto. En la etapa 2 el formilmetionil-tRNA$^{fMet}$ se asocia con el mRNA y el complejo de la subunidad ribosomal 30S uniéndose al IF2-GTP. En el paso 3, la subunidad 50S se une al complejo, el GTP se hidroliza y se libera IF2-GDP. El tRNA iniciador ingresa en el sitio P del ribosoma, mientras que todos los tRNA posteriores ingresan al sitio A (véase figura 11-47).

**PASO 3 DEL INICIO: ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO DE INICIO COMPLETO** Una vez que el tRNA iniciador se une al codón AUG y se desplaza el IF3, la subunidad grande (50S) se une al complejo y el GTP unido al IF2 se hidroliza (paso 3, véase figura 11-44). La hidrólisis del GTP conduce a un cambio conformacional en el ribosoma que se requiere para la liberación del IF2-GDP, lo que permite que continúe la traducción.

## Inicio de la traducción en las eucariotas

Los ribosomas eucarióticos son más grandes que los ribosomas bacterianos, tienen subunidades grandes y pequeñas que son 60S y 43S, contienen rRNA mayores y también contienen proteínas adicionales que no se encuentran en los ribosomas bacterianos. Los mRNA eucariotas poseen características especializadas, como tapas 5′ y colas 3′. No es de sorprender que el inicio de la traducción en eucariotas sea bastante diferente y más complejo que el proceso correspondiente en las bacterias y, además, es un paso importante en el que se ejerce control sobre la expresión génica (véase sección 12.19). Las células eucariotas requieren al menos de 12 factores de inicio, conocidos como eIFs para designar IFs eucariotas, que comprenden un total de más de 25 hebras polipeptídicas. Como se indica en la **FIGURA 11-45**, varias de estas eIF (p. ej., eIF1, eIF1A, eIF5 y eIF3) se enlazan a la subunidad 40S, que prepara la subunidad para enlazarse al mRNA. El tRNA iniciador unido a una metionina también se une a la subunidad 40S antes de su interacción con el mRNA. El tRNA iniciador entra en el sitio P de la subunidad en asociación con el IF2-GTP. Una vez que se han producido estos eventos, la pequeña subunidad ribosomal con sus factores de inicio asociados y el tRNA cargado (que juntos forman un complejo preiniciativo 43S) está listo para encontrar el extremo 5′ del mRNA, que porta la tapa de metilguanosina (página 420).

El complejo 43S se recluta originalmente al mRNA con la ayuda de un grupo de factores de inicio que ya están unidos al mRNA (consúltese figura 11-45). Entre estos factores: 1) el eIF4E se une a la tapa 5′ del eucariota mRNA; 2) el eIF4A se mueve a lo largo del extremo 5′ del mensaje eliminando cualquier región de doble hebra que pueda interferir con el movimiento del complejo 43S a lo largo del mRNA; y 3) el eIF4G sirve de conector entre el extremo tapado 5′ y el extremo 3′ poliadenilado del mRNA (véase figura 11-45). Así, en efecto, el eIF4G convierte un mRNA lineal en un mensaje circular.

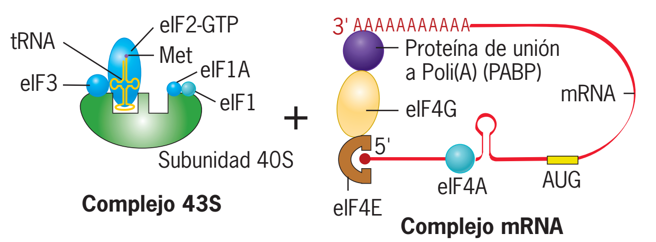



**FIGURA 11-45 Inicio de la síntesis de proteínas en eucariotas.** Como se discutió en el texto, el inicio comienza con la unión de dos complejos. Uno (llamado complejo 43S) contiene la subunidad ribosomal 40S unida a varios factores de inicio (eIF) y el tRNA iniciador, mientras que el otro contiene el mRNA unido a un grupo separado de factores de inicio. Esta unión está mediada por una interacción entre el eIF3 en el complejo 43S y el eIF4G en el complejo de mRNA. Se cree que el eIF1 y eIF1A inducen un cambio conformacional en la pequeña subunidad ribosomal que abre un "cerrojo" para acomodar la entrada del mRNA. Una vez que el complejo 43S se ha unido al extremo 5′ del mRNA, hace un escaneo detallado a lo largo del mensaje hasta que alcanza el codón de inicio AUG apropiado.

Una vez que el complejo 43S se une al extremo 5′ del mRNA, el complejo hace un escaneo detallado a lo largo del mensaje hasta que alcanza una secuencia reconocible de nucleótidos (por lo general 5′—CCACCAUGC—3′) que contiene el codón de inicio AUG. Una vez que el complejo 43S alcanza el codón AUG apropiado, el GTP unido al IF2 se hidroliza y la subunidad grande (60S) se une al complejo. La formación del ribosoma 80S completo requiere la actividad de otra proteína de unión al GTP llamada eIF5B-GTP, cuyo GTP unido también se hidroliza. La hidrólisis de los dos GTP unidos, y la formación del ribosoma completo, va acompañada de la liberación de todos los factores de inicio. Estos eventos dejan el anticodón del iniciador tRNA unido al codón de inicio AUG en el sitio P del ribosoma ensamblado. El complejo ahora está listo para el primer paso en la elongación.[9, 10]

## Papel del ribosoma

Llegados al punto en el que se ha ensamblado un ribosoma completo, podemos observar más de cerca la estructura y la función de esta estructura multisubunidad. Los ribosomas son máquinas moleculares, similares en algunos aspectos a los motores moleculares descritos en el capítulo 9. Durante la traducción un ribosoma se somete a un ciclo repetitivo de cambios mecánicos, que se controla con la energía liberada por la hidrólisis del GTP. A diferencia de la miosina o la cinesina, que simplemente se mueven a lo largo de una trayectoria física, los ribosomas se mueven a lo largo de una "cinta" de mRNA que contiene información codificada. En otras palabras, los ribosomas son máquinas *programables*: la información almacenada en el mRNA determina la secuencia de aminoacil-tRNA que el ribosoma acepta durante la traducción. Otra característica que distingue a los ribosomas de muchas otras máquinas celulares es la importancia de sus RNA componentes. Los RNA ribosómicos desempeñan un papel importante en la selección de los tRNA, lo que garantiza la traducción precisa, la unión de los factores proteicos, y la polimerización de los aminoácidos (discutidos en "Vías experimentales" en la sección 11.20).

Los primeros estudios que utilizaron técnicas de imágenes microscópicas crioelectrónicas de alta resolución (consúltese sección 18.16) revelaron que el ribosoma es una estructura muy irregular con protuberancias, lóbulos, canales y puentes (véase figura 2-57). Estos estudios, llevados a cabo principalmente por Joachim Frank y sus colegas de la Universidad de Columbia, también proporcionaron descripciones de los principales cambios conformacionales que ocurren dentro del ribosoma durante la traducción. En la década de 1990 se realizaron importantes avances en la cristalización de los ribosomas, y hacia el final del año aparecieron los primeros informes de la estructura cristalográfica de rayos X de los ribosomas procarióticos. Las figuras 11-48*a*) y *b*) muestran la estructura general de las dos subunidades ribosomales de un ribosoma bacteriano, como se revela por cristalografía de rayos X. Más recientemente la cristalografía de rayos X se ha aplica-

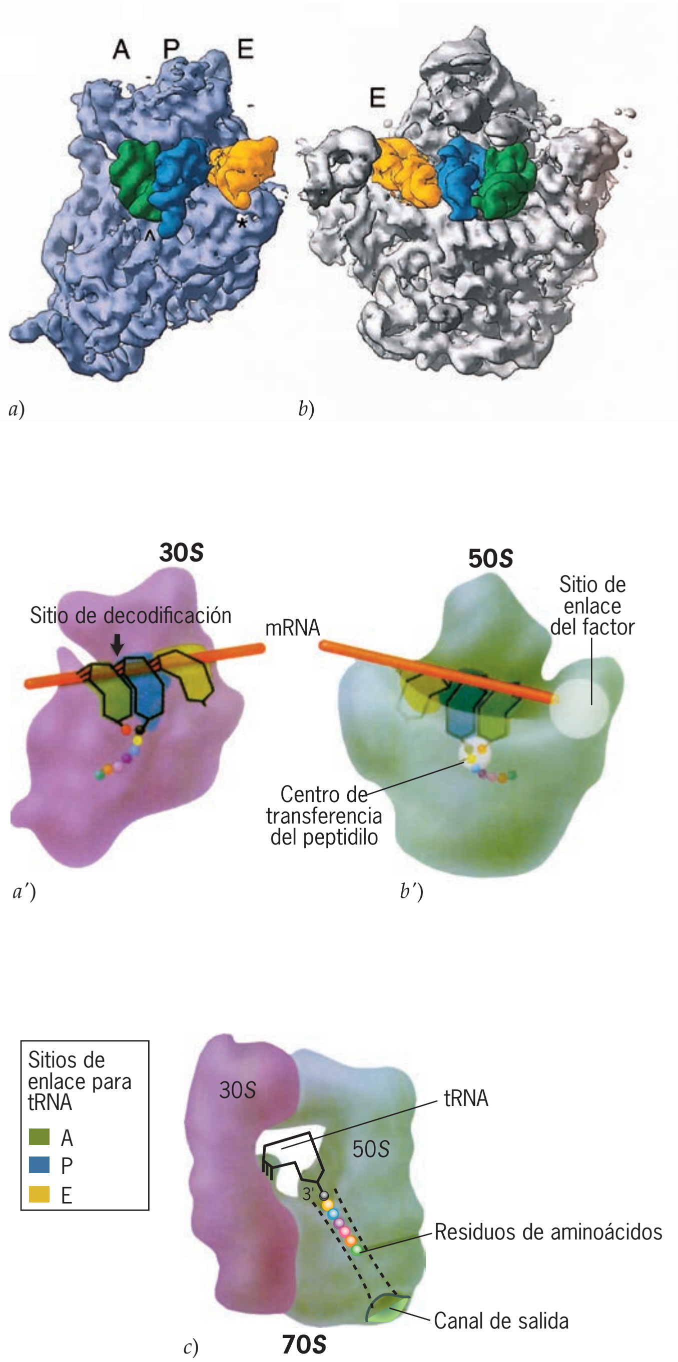



**FIGURA 11-46 Modelo del ribosoma bacteriano basado en datos cristalográficos de rayos X, que muestran los tRNA unidos a los sitios A, P y E de las dos subunidades ribosomales.** *a-b*) Vistas de las subunidades 30S y 50S, respectivamente, con los tres tRNA enlazados que se muestran en la interfaz entre las subunidades. *a′-b′*) Dibujos correspondientes a las estructuras que se muestran en las partes *a* y *b*. El dibujo en *a′* de la subunidad 30S muestra las ubicaciones aproximadas del anticodón de los tres tRNA y su interacción con los codones complementarios del mRNA. El dibujo en *b′* de la subunidad 50S muestra los sitios de tRNA de la dirección inversa. Los extremos aceptores de aminoácidos de los tRNA de los sitios A y P están muy próximos dentro del sitio de transferencia de peptidilo de la subunidad, donde se produce la formación del enlace peptídico. Los sitios de unión para los factores de elongación EF-Tu y EF-G están ubicados en la protuberancia en el lado derecho de la subunidad. *c*) Dibujo del ribosoma bacteriano 70S que muestra el espacio entre las dos subunidades que son abarcadas por cada molécula de tRNA, y el canal dentro de la subunidad 50S a través del cual el polipéptido naciente sale del ribosoma.

FUENTE: *a-b*) A partir de Jamie H. Cate, *et al*. Cortesía de Harry F. Noller, *Science* 1999;285:2100; c) A. Liljas, *Science* 1999;285:2078; ambos © 1999, Reproducido con permiso de AAAS.

[9] No todos los mRNA se transcriben después de la unión de la subunidad ribosomal pequeña al extremo 5′ del mensaje. Muchos mRNA virales, y un número relativamente pequeño de mRNA celulares, especialmente los utilizados durante la mitosis o durante periodos de estrés, se transcriben como el resultado de la unión del ribosoma al mRNA en un *sitio interno de entrada al ribosoma* (IRES, *internal ribosome entry site*), que se puede localizar a cierta distancia del extremo 5′ del mensaje.

[10] La descripción presentada aquí se refiere a la traducción en estado estable, donde un mRNA es traducido repetidamente por numerosos ribosomas. La primera ronda de traducción (o pionera) tiene varias propiedades únicas. Por ejemplo, la tapa en el extremo 5′ del mRNA está unida por un complejo heterodímero de unión a la tapa (CBC) en lugar de por la proteína eIF4E. Las diferencias entre las rondas de traducción pioneras y estables se tratan en *Cell* 2010;142:368.

do con éxito al estudio del ribosoma eucariótico mucho más grande, que comparte la misma estructura central y funciones primarias con su contraparte procariota. Al mismo tiempo, los avances en la microscopía crioelectrónica han permitido determinar la estructura atómica del ribosoma sin cristalización, lo que facilita la determinación de la estructura del ribosoma en una amplia gama de estados durante el proceso de traducción. Estos estudios estructurales, en combinación con los análisis bioquímicos, han abierto una ventana a la compleja función dinámica del ribosoma.

Cada ribosoma tiene tres sitios para asociarse con moléculas de RNA de transferencia. Estos sitios, denominados el **sitio A (aminoacilo)**, el **sitio P (peptidilo)** y el **sitio E (salida)**, reciben cada tRNA en pasos sucesivos del ciclo de elongación, tal como se describe en la siguiente sección. Las posiciones de los tRNA unidos a los sitios A, P y E de la subunidad ribosomal pequeña y grande se muestran en la **FIGURA 11-46*a*, *b***. Los tRNA se enlazan dentro de estos sitios y cubren el espacio entre las dos subunidades ribosomales (obsérvese figura 11-46c). Los extremos anticodón de los tRNA unidos entran en contacto con la subunidad pequeña, que desempeña un papel clave en la decodificación de la información contenida en el mRNA. Por el contrario, los extremos que llevan los aminoácidos de los tRNA enlazados entran en contacto con la subunidad grande, que desempeña un papel clave en la formación de enlaces peptídicos catalizadores. Otras características principales reveladas por estos estudios estructurales de alta resolución incluyen lo siguiente:

1. La interfaz entre las subunidades pequeñas y grandes forma una cavidad relativamente espaciosa (véase figura 11-46c), revestida casi exclusivamente por RNA. El lado de la subunidad pequeña que mira hacia esta cavidad está alineado a lo largo de su longitud por una sola hélice de RNA continua de doble hebra. Esta hélice está sombreada en la estructura bidimensional del rRNA 16S en la figura 11-3. Las superficies de las dos subunidades que se enfrentan entre sí contienen los sitios de unión para el mRNA y los tRNA entrantes, y por tanto son de importancia clave para la función del ribosoma. El hecho de que estas superficies consisten principalmente de RNA apoya la propuesta de que los ribosomas primordiales estaban compuestos exclusivamente por RNA (p. 430).
2. El sitio activo, donde los aminoácidos están unidos en forma covalente entre sí, también consiste en RNA. Esta porción catalítica de la subunidad grande reside en una hendidura profunda que protege el enlace peptídico recién formado de la hidrólisis por el disolvente acuoso.
3. El mRNA está situado en un surco estrecho que serpentea alrededor del cuello de la subunidad pequeña y pasa por los sitios A, P y E. Antes de entrar en el sitio A el mRNA se despoja de cualquier estructura secundaria que pudiera poseer por una aparente actividad helicasa del ribosoma.
4. Un túnel se propaga completamente a través del núcleo de la subunidad grande que comienza en el sitio activo. Este túnel proporciona un pasaje para la translocación del polipéptido que se alarga a través del ribosoma (consúltese figura 11-46*c*).
5. La mayoría de las proteínas de las subunidades ribosomales tienen múltiples sitios de enlace al RNA, y están idealmente situadas para estabilizar la compleja estructura terciaria de los rRNA.

**REPASO**

1. ¿Cómo sabe la subunidad ribosomal pequeña dónde comenzar el inicio de la traducción en las procariotas? ¿Cómo difiere este paso en las eucariotas?
2. ¿Qué sistema de inicio, procariótico o eucariótico, implica escanear?

## 11.17 Traducción de información genética: elongación y terminación

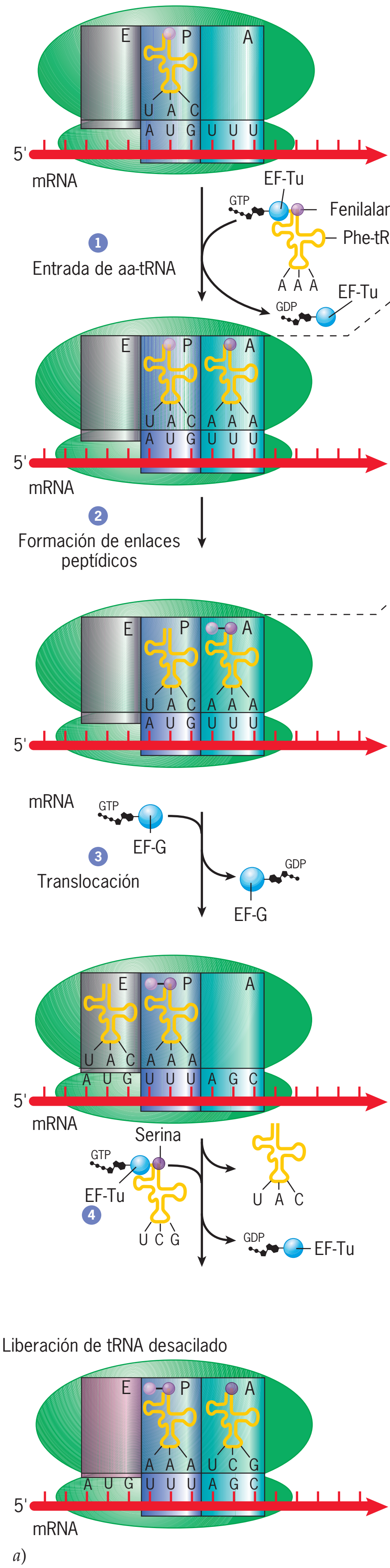
Tras el inicio, la síntesis de una cadena polipeptídica procede a la elongación y a la terminación. Los pasos básicos en el proceso de elongación de la traducción en las células bacterianas se ilustran en la **FIGURA 11-47**. Esta serie de pasos se repite una y otra vez, a medida que los aminoácidos se polimerizan uno tras otro en la cadena polipeptídica en crecimiento.

### Paso 1 de la elongación: selección del aminoacil-tRNA

Con el tRNA iniciador cargado en su lugar dentro del sitio P, el ribosoma está disponible para la entrada del segundo aminoacil-tRNA en el sitio A vacante, que es el primer paso en la elongación (paso 1, véase figura 11-47*a*). La unión del segundo aminoacil-tRNA en el sitio A requiere una GTPasa, conocida como factor de elongación EF-Tu (o Tu) en las bacterias y eEF1A en las eucariotas. Se requiere que el EF-Tu entregue los aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma. Aunque cualquier complejo aminoacil-tRNA-Tu-GTP puede entrar en el sitio, sólo uno cuyo anticodón es complementario al codón de mRNA situado en el sitio A, activará los cambios conformacionales necesarios dentro del ribosoma que hacen que el tRNA permanezca unido al mRNA en el centro de decodificación. Una vez que el aminoacil-tRNA-Tu-GTP apropiado se une al codón de mRNA, el GTP se hidroliza y se libera el complejo Tu-GDP, dejando el aa-tRNA recién llegado ubicado en el sitio A del ribosoma.

### Paso 2 de la elongación: formación de enlaces peptídicos

Al final del primer paso los dos aminoácidos, unidos a sus tRNA separados, se yuxtaponen entre sí y se alinean con precisión para interactuar químicamente (obsérvese figura 11-46*a*′, *b*′). En el caso del primer enlace peptídico de una nueva hebra de proteína, el sitio P contendría el iniciador tRNA, pero para todos los demás enlaces peptídicos de la proteína el sitio P contendrá un tRNA unido a la hebra peptídica en crecimiento. En todos los casos el sitio A contiene el aminoacil-tRNA recién llegado que se debe agregar para que la hebra se alargue. Para recordar que el sitio P contiene la hebra peptídica en crecimiento, y el sitio A contiene el aminoácido recién llegado que se agregará a la hebra, es útil observar que la “cadena peptídica” y el “aminoacil-tRNA” comienzan con las letras P y A, respectivamente. El segundo paso en el ciclo de elongación es la formación de un enlace peptídico entre estos dos aminoácidos (paso 2, consúltese figura 11-47a). La formación del enlace peptídico se realiza cuando el nitrógeno amínico del RNAaa en el sitio A lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del aminoácido unido al tRNA del sitio P, desplazando el tRNA del sitio P (consúltese figura 11-47*b*). Como resultado de esta reacción, el tRNA unido en el sitio A tiene un dipéptido unido, mientras que el tRNA en el sitio P está desacilado. La formación de enlaces peptídicos ocurre espontáneamente sin la entrada de energía externa. La **peptidil transferasa,** un componente de la gran subunidad del ribosoma, cataliza la reacción. Durante años se supuso que la peptidil transferasa era una de las proteínas del ribosoma. Más tarde, a medida que los poderes catalíticos del RNA se hicieron evidentes, la atención se desplazó al RNA ribosómico como el catalizador para la formación del enlace peptídico. Ahora se ha demostrado que la actividad peptidil transferasa del tRNA y el ribosoma no la proporciona ninguna de las subunidades de proteína, sino que se realiza en el sitio P tRNA con la ayuda de nucleótidos de la gran molécula de ARN ribosomal. En otras palabras, la peptidil transferasa es un ribozima, compuesto de residuos nucleotidos de



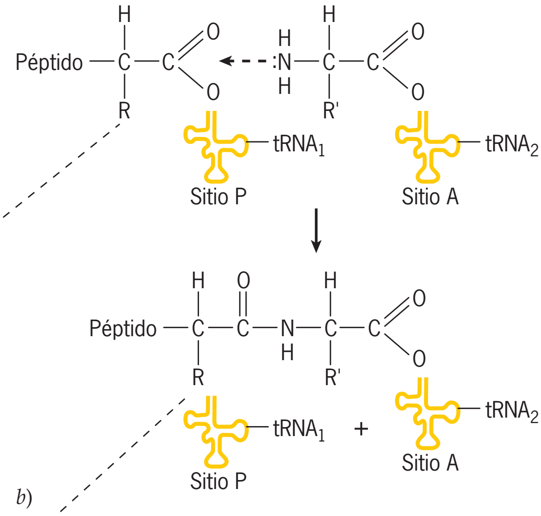




**FIGURA 11.47 Representación esquemática de los pasos de la elongación durante la traducción en bacterias.** *a*) En la etapa 1, un aminoacil-tRNA cuyo anticodón es complementario al segundo codón del mRNA entra en el sitio A vacío del ribosoma. La unión del tRNA se acompaña de la liberación de EF-Tu-GDP. En el paso 2, la formación del enlace peptídico se realiza mediante la transferencia de la cadena polipeptídica naciente desde el tRNA en el sitio P al aminoacil-tRNA del sitio A, formando un dipéptido-tRNA en el sitio A y un tRNA desacilado en el sitio P. La reacción es catalizada por una parte del rRNA, que actúa como una ribozima. En el paso 3, la unión de EF-G y la hidrólisis de su GTP asociado resultan en la translocación del ribosoma con respecto al mRNA. La translocación va acompañada del movimiento del tRNA desacetilado y el peptidil-tRNA en los sitios E y P, respectivamente. En el paso 4, el tRNA desacilado sale del ribosoma y un nuevo aminoacil-tRNA entra en el sitio A. *b*) Formación del enlace peptídico y desplazamiento posterior del tRNA desacilado. Un ribosoma puede catalizar la incorporación de 10 a 20 aminoácidos por segundo en un polipéptido en crecimiento, que es alrededor de 10 millones de veces mayor que el observado en la reacción no catalizada usando sustratos modelo en solución.

tRNA y ribosoma, un tema discutido en “Vías experimentales” en la sección 11.20.

## Paso 3 de la elongación: translocación

La formación del primer enlace peptídico deja un extremo de la molécula de tRNA del sitio A aún unido a su codón complementario en el mRNA, y el otro extremo de la molécula unido a un dipéptido (paso 2, véase figura 11-47*a*). El tRNA del sitio P ahora carece de cualquier aminoácido enlazado. El siguiente paso, llamado **translocación**, se caracteriza por un pequeño movimiento de trinquete (6°) de la subunidad pequeña en relación con la subunidad grande, que se representa en la **FIGURA 11-48*a*)**. Como resultado de este movimiento el ribosoma mueve tres nucleótidos (un codón) a lo largo del mRNA en la dirección 5′→3′ (paso 3, obsérvese figura 11-47*a*). La translocación va acompañada del movimiento de 1) el dipeptidil-tRNA desde el sitio A hasta el sitio P del ribosoma, y 2) el tRNA desacilado desde el sitio P hasta el sitio E. A medida que se producen estos movimientos, estos dos tRNA permanecen unidos por enlaces de hidrógeno a sus codones en el mRNA. Se ha visualizado una etapa intermedia en el proceso de translocación mediante microscopía crioelectrónica, que muestra los tRNA que ocupan “estados híbridos” parcialmente translocados. En estos estados híbridos los extremos anticodón de los tRNA aún residen en los sitios A y P de la subunidad pequeña, mientras que los extremos aceptores de los tRNA se

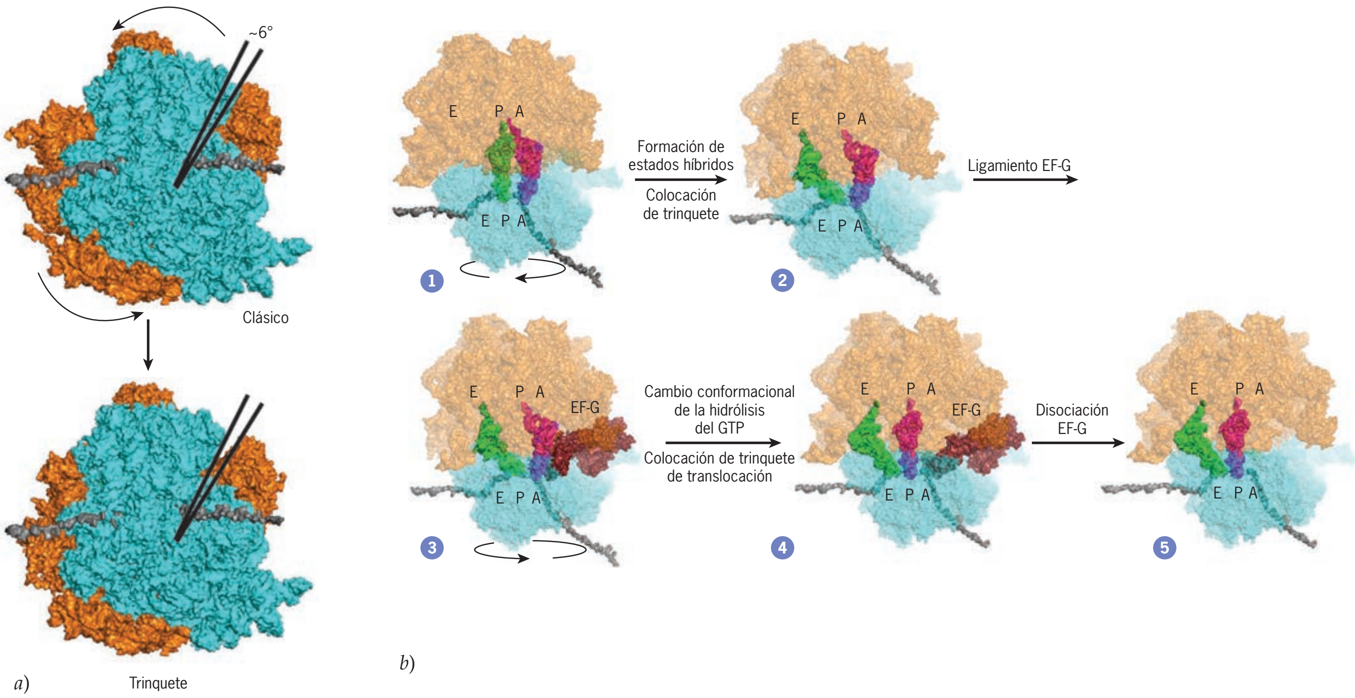



**FIGURA 11-48 Modelo estructural de las etapas de translocación durante la elongación traslacional en bacterias.** *a*) Representación del cambio del ribosoma procariótico del estado clásico al de trinquete, que implica una rotación de 6° de las subunidades relacionadas entre sí. (La discusión detallada de esta rotación se puede encontrar en *Ann Rev Biophys* 2010;39:227). *b*) Los pasos que ocurren durante la translocación se describen en el texto.

FUENTE: *a-b*) T. Martin Schmeing y V. Ramakrishnan, *Nature* 2009;461:1238. Reimpreso con autorización de Macmillan Publishers Ltd. Cortesía de Venki Ramakrishnan.

han movido a los sitios P y E de la subunidad grande. Se dice que los tRNA ocupan sitios híbridos A/P y P/E, respectivamente. Los diversos pasos que ocurren durante el proceso de translocación se muestran en la figura 11-48*b*). El cambio del estado "clásico" sin trinquete en el paso 1, figura 11-48*b*), al estado híbrido con trinquete (paso 2) se produce de manera espontánea; es decir, sin la participación de otros factores. Parece que el ribosoma puede oscilar espontáneamente hacia adelante y hacia atrás entre estos dos estados. Una vez que ha cambiado al estado híbrido, un factor de elongación del GTP (EF-G en bacterias y eEF2 en eucariotas) se une al ribosoma (paso 3), se estabiliza el ribosoma en el estado de trinquete y se evita así el movimiento de los tRNA para volver a la conformación clásica A/A y P/P. Entonces la hidrólisis del GTP ligado genera un cambio conformacional que mueve el mRNA, y los lazos anticodón asociados de los tRNA, en relación con la subunidad ribosomal pequeña, que coloca los tRNA enlazados en los estados E/E y P/P y deja el sitio A vacío (paso 4). Al mismo tiempo el ribosoma se restablece al estado de no trinquete. Después de esta reacción, el EF-G-GDP se disocia del ribosoma (paso 5).

## Paso 4 de la elongación: liberación del tRNA desacilado

En la etapa final de elongación (paso 4, consúltese figura 11-47*a*) el tRNA desacilado sale del ribosoma y deja vacío el sitio E.

Para cada ciclo de elongación, al menos dos moléculas de GTP se hidrolizan: una durante la selección del aminoacil-tRNA y otra durante la translocación. Cada ciclo de elongación tarda aproximadamente una vigésima de segundo, cuya mayor parte tal vez se gasta muestreando la aa-tRNA del citosol circundante. Una vez que el peptidil-tRNA se ha trasladado al sitio P por translocación, el sitio A se abre nuevamente a la entrada de otro aminoacil-tRNA, en este caso uno cuyo anticodón es complementario del tercer codón (obsérvese figura 11-47*a*). Cuando el tercer tRNA cargado está asociado con el mRNA en el sitio A, el aa-tRNA del sitio A desplaza el dipéptido del tRNA del sitio P, se forma el segundo enlace peptídico y, como resultado, un tripéptido unido al tRNA en el sitio A. El tRNA en el sitio P una vez más está desprovisto de un aminoácido. A la formación del enlace peptídico le sigue la translocación del ribosoma al cuarto codón y la liberación del tRNA desacilado, después de lo cual el ciclo está listo para comenzar nuevamente. Por tanto, cada tRNA pasa por tres posiciones en el ribosoma: primero se une al sitio A, tras la formación del enlace peptídico se desplaza al sitio P, y más adelante, después de la siguiente ronda de formación del enlace peptídico, se mueve al sitio E desde donde sale del ribosoma. Esta secuencia, de A a P a E, se puede recordar al pensar en un mono (el tRNA) que se balancea de árbol en árbol y hace recordar el acrónimo "Ape".

Hemos visto en esta sección cómo el ribosoma mueve a la vez tres nucleótidos (un codón) a lo largo del mRNA. La secuencia particular de codones en el mRNA utilizada por un ribosoma (es decir, el marco de lectura) se fija en el momento en que el ribosoma se une al codón de inicio al comienzo de la traducción. Algunas de las mutaciones más destructivas son aquellas en las que se agrega o elimina un único par de bases del DNA. Considérese el efecto de una adición de uno o dos nucleótidos, o una eliminación de uno o dos nucleótidos en una secuencia dada (véase figura 11-39*d*). El ribosoma se mueve a lo largo del mRNA en el marco de lectura incorrecto desde el punto de mutación hasta el resto de la secuencia de codificación. Las mutaciones de este tipo se llaman **mutaciones de cambio de marco.** Las mutaciones de cambio de marco conducen al ensamblaje de una secuencia de aminoácidos completamente anormal desde el punto de la mutación. Se puede observar que después de más de dos décadas en las que se asumió que el ribosoma siempre se movía de un triplete al siguiente, se descubrieron varios ejemplos en los

que el mRNA contiene una señal de recodificación que hace que el ribosoma cambie su marco de lectura, ya sea al respaldar un nucleótido (un corrimiento al marco –1) o al omitir un nucleótido (un cambio al marco +1).

Una amplia variedad de antibióticos tienen su efecto al interferir con diversos aspectos de la síntesis de proteínas en las células bacterianas (consúltese sección 3.8). Por ejemplo, la estreptomicina se une selectivamente a la pequeña subunidad ribosomal de las células bacterianas, hace que algunos de los codones del mRNA sean mal interpretados y que aumente así la síntesis de proteínas aberrantes. A causa de que el antibiótico no se une a los ribosomas eucarióticos, no tiene ningún efecto en la traducción de los mRNA de la célula hospedadora. La resistencia de la bacteria a la estreptomicina se puede rastrear a los cambios en las proteínas ribosomales, particularmente la S12.

## Terminación

Como se muestra en la figura 11-38, tres de los 64 codones de trinucleótidos funcionan como codones de terminación, que finalizan el ensamblaje del polipéptido en vez de codificar un aminoácido. No existen tRNA cuyos anticodones sean complementarios a un codón de terminación.[11] Cuando un ribosoma alcanza uno de estos codones, UAA, UAG o UGA, la señal se lee para detener la elongación adicional y liberar el polipéptido asociado con el último tRNA.

[11] Hay pequeñas excepciones a esta declaración. Se afirma en este capítulo que los codones dictan la incorporación de 20 aminoácidos diferentes. De hecho, existe un aminoácido 21 —llamado selenocisteína— que se incorpora a un número muy pequeño de polipéptidos. La selenocisteína es un aminoácido raro que contiene selenio metálico. En los mamíferos, por ejemplo, ocurre en una docena de proteínas involucradas en reacciones de oxidación-reducción. La selenocisteína tiene su propio tRNA, llamado tRNA$^{Sec}$, pero carece de su propia aa-tRNA sintetasa. Este tRNA único es reconocido por la serina-tRNA sintetasa, que une una serina al extremo 39 de la tRNA$^{Sec}$. Después del acoplamiento la serina se altera enzimáticamente a una selenocisteína. La selenocisteína está codificada por el UGA, que es una de las tres condiciones de parada. En la mayoría de los casos el UGA se lee como una señal de terminación. Sin embargo en algunos casos, al UGA le sigue una región plegada del mRNA que se une a un factor de elongación especial, que hace que el ribosoma reclute un tRNA$^{Se}$c en el sitio A en lugar de un factor de terminación. Un aminoácido 22, la pirrolisina, está codificado por otro codón de parada (UAG) en el código genético de algunas arqueas. La pirrolisina tiene sus propios tRNA y aa-tRNA sintetasa.

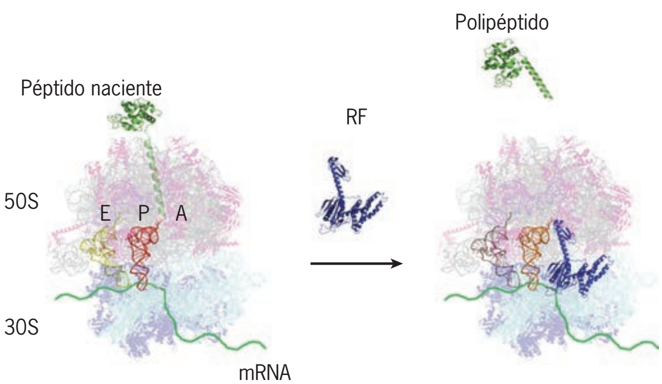



**FIGURA 11-49 Modelo estructural del primer paso de terminación traslacional en bacterias.** Cuando el ribosoma alcanza un codón de detención UAA o UAG, un RF clase I ingresa al sitio A y se alinea de manera similar a la de un aa-tRNA entrante. Un dominio de la RF que reside en el centro peptidil transferasa del ribosoma promueve la hidrólisis del enlace éster que une el polipéptido al peptidil-tRNA en el sitio P, y libera de este modo el polipéptido completado.

FUENTE: HS Zaher y R. Green. *Cell* 2009;136:747, con permiso de Elsevier. Cortesía de Rachel Green, Escuela de Medicina Johns Hopkins.

La terminación requiere *factores de liberación (*RF, *release factors*). Los factores de liberación se pueden dividir en dos grupos: RF de clase I, que reconocen codones de terminación en el sitio A del ribosoma, y RF de clase II, proteínas de unión al GTP (proteínas G) cuyas funciones no se conocen bien. Las bacterias tienen dos RF de clase I: el RF1 que reconoce los codones de terminación UAA y UAG, y el RF2 que reconoce los codones de terminación UAA y UGA. Las eucariotas tienen un único RF de clase I, el eRF1, que reconoce los tres codones de parada. Los RF de clase I ingresan al sitio A del ribosoma como se muestra en la **FIGURA 11-49**. Una vez en el sitio A, se cree que un tripéptido conservado en un extremo del factor de liberación interacciona con el codón de parada en el sitio A, y dispara un cambio conformacional crucial que afecta a varios nucleótidos del mRNA en la subunidad ribosomal pequeña. Entonces el enlace éster que une la hebra polipeptídica naciente con el tRNA se hidroliza, y se libera el polipéptido completado. En este punto la hidrólisis del GTP unido al RF de clase II (RF3 o eRF3) conduce a la liberación de RF de clase I del sitio A del ribosoma. Los pasos finales en la traducción incluyen la liberación del tRNA desacilado del sitio P, la disociación del mRNA del ribosoma y el desensamblaje del ribosoma en sus subunidades grandes y pequeñas, en preparación para otra ronda de traducción. Estos pasos finales requieren una serie de factores proteicos, y son bastante diferentes en eucariotas y bacterias. En las células bacterianas estas proteínas incluyen la EF-G, IF3 y RRF (factor de reciclado del ribosoma), que promueve la separación de la subunidad ribosomal.

**REPASO**

1. Describa algunas de las formas en que el paso de inicio de la traducción difiere de los pasos de elongación del mismo proceso.
2. Durante la elongación de la traducción, se puede decir que un aminocil-tRNA entra en el sitio A, un peptidil-tRNA en el sitio P y un tRNA desacilado en el sitio E. Explique cómo ocurre cada uno de estos eventos.

## 11.18 Vigilancia mRNA y control de calidad

Como los tres codones de terminación se pueden formar fácilmente por cambios en la base simple de muchos otros codones (véase figura 11-38), se podrían esperar mutaciones que produzcan codones de terminación dentro de la secuencia codificante de un gen (consúltese figura 11-39c). Las mutaciones de este tipo, denominadas **mutaciones sin sentido**, se han estudiado durante décadas y son responsables de aproximadamente 30% de los trastornos hereditarios en los seres humanos. Como también se les llama, los codones de terminación prematura, o PTC para abreviar, por lo común también se introducen en los mRNA durante el empalme. Las células poseen un mecanismo de vigilancia mRNA capaz de detectar mensajes con codones de terminación prematura. En la mayoría de los casos, los mRNA que contienen tales mutaciones se transcriben sólo una vez antes de ser destruidos selectivamente por un proceso llamado **degradación mediada por mutación sin sentido (*NMD, nonsense-mediated decay*)**. La NMD protege a la célula de la producción de proteínas acortadas, no funcionales.

¿Cómo es posible que una célula distinga entre un codón de terminación legítimo que se supone que finaliza la traducción de un mensaje y un codón de terminación prematuro? Para comprender esta hazaña, tenemos que reconsiderar los eventos que ocurren durante el procesamiento de los pre-mRNA en células de mamíferos. No se mencionó anteriormente, pero cuando un intrón se elimina mediante un espliceosoma, se deposita un complejo de proteínas en el transcripto a 20-24 nucleótidos corriente

arriba de la unión exón-exón recién formada. Este punto de referencia del proceso de empalme se llama **complejo exón-unión (EJC, *exon-junction complex*)**, que se queda con el mRNA hasta que se traduce. Es típico que en un mRNA normal el codón de terminación esté presente en el último exón y, por tanto, el último EJC está corriente arriba de ese sitio. Mientras un mRNA se somete a su ronda inicial de traducción, se cree que los EJC están desplazados o inactivados por el ribosoma que avanza. Cualquier mensaje con un EJC dejado sobre él cuando el ribosoma termina la traducción está marcado para la degradación por ribonucleasas. Debido a que los codones de parada normales ocurren después del último intrón y, por tanto, corriente abajo del último EJC, en el momento en que un ribosoma finaliza la traducción y se disocia, al mensaje se le quitarán todos sus EJC. Pero considérese lo que sucedería durante la traducción de un mRNA que contenga un codón de terminación prematuro. El ribosoma se detendría en el sitio de la mutación y luego se disociaría, lo que deja cualquier EJC que estuviera unido al mRNA corriente abajo del sitio de terminación prematura. Estos EJC remanentes ponen en marcha una serie de eventos que conducen a la destrucción enzimática del mensaje anormal.

La NMD es mejor conocida por su papel en la eliminación de mRNA transcriptos de genes mutantes que contienen codones de parada prematuros, como los responsables de la fibrosis quística o la distrofia muscular. Para los heterocigotos que portan un alelo normal y uno que causa enfermedad, la NMD puede eliminar la proteína codificada por el alelo mutante, evitando así un efecto potencialmente tóxico. Para los homocigotos portadores de dos alelos que causan enfermedades, la NMD en realidad puede resultar muy dañina, ya que previene la producción de proteínas mutantes acortadas que a menudo poseen alguna actividad. Varias compañías de biotecnología están desarrollando medicamentos para tratar enfermedades causadas por codones de parada prematuros, ya sea al hacer que el exón que contiene el codón de terminación se omita durante el empalme (una estrategia llamada *omisión del exón*), al interferir con la NMD, o al permitir que los ribosomas lean a través de un PTC en lugar de terminar la traducción. Los tres tipos de fármacos deberían permitir que los RNA con codones sin sentido se traduzcan en proteínas que aún conservan alguna función, en lugar de degradar todo el mensaje por NMD. Aunque la proteína codificada por el gen mutante en presencia de tales fármacos será anormalmente corta, o tendrá una secuencia de aminoácidos anormal, todavía podría poseer suficiente función residual para rescatar a los pacientes de una enfermedad que de otro modo sería mortal. En 2014 comenzaron nuevos ensayos clínicos para dos fármacos en desarrollo, Eteplirsen y SRP-4053, que promueven la omisión del exón en la distrofina del gen de la distrofia muscular, con el fin de evitar la NMD del gen mutante.

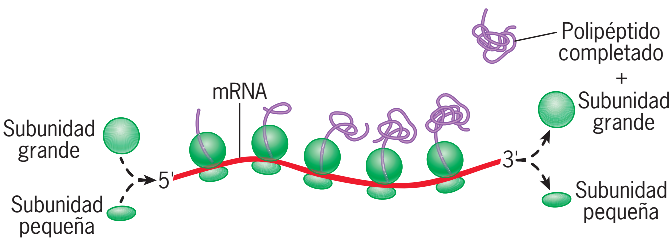
La NMD es otro recordatorio de la naturaleza oportunista de la evolución biológica. Del mismo modo que la evolución aprovechó la presencia de intrones para facilitar la migración de exones (página 429), también utilizó el proceso mediante el cual se eliminan estos insertos genéticos para establecer un mecanismo de control de calidad, que garantiza que sólo los mRNA no contaminados avancen hacia una etapa donde se pueden traducir.

**REPASO**

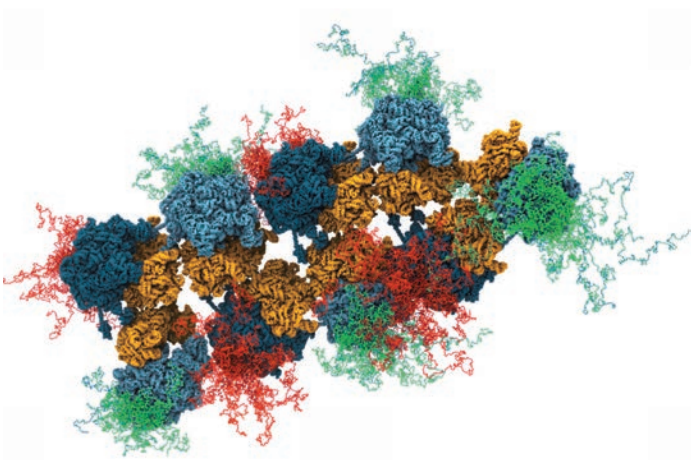
1. ¿En qué se diferencia el efecto de una mutación sin sentido de la mutación de marco de lectura? ¿Por qué?

## 11.19 Polirribosomas

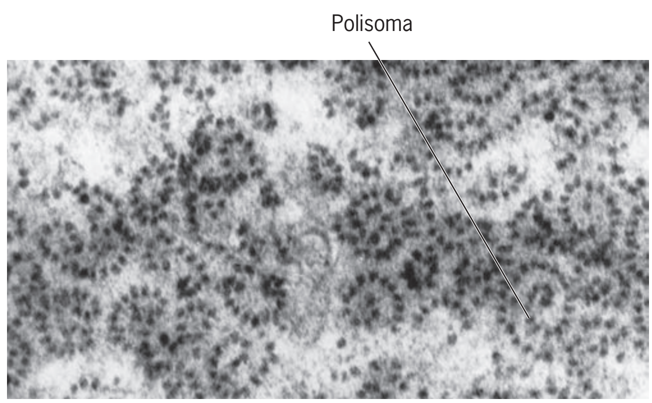
Cuando se examina en el microscopio electrónico un RNA mensajero durante el proceso de traducción, se observa invariablemente que varios ribosomas se unen a lo largo de la fibra del mRNA. Este complejo de ribosomas y mRNA se llama **polirribosoma** o **polisoma** (consúltese **FIGURA 11-50*a***). Cada uno de los ribosomas se ensambla inicialmente a partir de sus subunidades en el codón de inicio, y luego se mueve desde ese punto hacia el extremo 3′ del mRNA hasta que alcanza un codón de termina-




*a*)



*b*)




*c*)

**FIGURA 11-50 Polirribosomas.** *a*) Dibujo esquemático de un polirribosoma (polisoma). *b*) Este modelo tridimensional se generó a partir de tomogramas crioelectrónicos de polisomas bacterianos en el acto de la traducción *in vitro*. Para obtener los tomogramas, las preparaciones se vitrificaron (congeladas en hielo sólido similar a vidrio sin formación de cristales de hielo) en etano líquido a –196 °C. Luego se tomaron micrografías electrónicas con la muestra colocada en varios ángulos de inclinación y se proporcionaron los datos para generar una reconstrucción tridimensional. *c*) Micrografía electrónica de una sección de rozamiento a través del borde exterior de una cavidad ER rugosa. Los ribosomas están alineados en lazos y espirales, lo que indica su unión a las moléculas de mRNA para formar polisomas.

FUENTE: *a*-*b*) A partir de Florian Brandt, *et al.* Cortesía de Wolfgang Baumeister, *Cell* 2009;136:267; con el permiso de Elsevier; *c*) Don W. Fawcett/Investigadores fotográficos/Getty Images, Inc.

ción. A medida que cada ribosoma se aleja del codón de inicio, otro ribosoma se une al mRNA y comienza su actividad de traducción. La velocidad a la que ocurre el inicio de la traducción varía con el mRNA que se estudia; algunos mRNA tienen una densidad mucho mayor de ribosomas asociados que otros. La traducción simultánea del mismo mRNA por numerosos ribosomas aumenta en gran medida la velocidad de síntesis de las proteínas dentro de la célula. Los estudios que utilizan la tomografía crioelectrónica (consúltese sección 18.16) han sugerido que el arreglo tridimensional y la orientación de los ribosomas dentro de un polisoma "libre" (es decir, no unido a la membrana) están muy altamente ordenados. Un modelo de un polisoma generado por esta técnica se muestra en la figura 11-50*b*). Los ribosomas que componen este modelo de polisoma están densamente empaquetados y han adoptado un arreglo de "doble fila". Además, cada uno de los ribosomas individuales está orientado de modo que su polipéptido naciente (filamentos rojos o verdes) está situado en la superficie exterior que mira al citosol. Se ha sugerido que esta orientación maximiza la distancia entre hebras nacientes, lo que minimiza la probabilidad de que estas interactúen entre sí y, posiblemente, que se asocien. La figura 11-50*c*) muestra una micrografía electrónica de polisomas unidos a la superficie citosólica de la membrana ER. Se presume que estos polisomas se habían dedicado a la síntesis de membrana y/o proteínas de organelos en el momento en que se fijó la célula (página 268). Los ribosomas dentro de cada polisoma parecen estar organizados en la superficie de la membrana ER en un lazo circular o espiral.

Ahora que hemos descrito los eventos básicos de transcripción y traducción, es conveniente cerrar el capítulo con una imagen que muestre ambos procesos en una célula procariota (véase **FIGURA 11-51**). A diferencia de las células eucariotas, en las que la transcripción ocurre en el núcleo y la traducción en el citoplasma con muchos pasos intermedios, las correspondientes actividades en las células bacterianas están estrechamente relacionadas. Por tanto, la síntesis de proteínas en las células bacterianas comienza en las plantillas del mRNA mucho antes de que el mRNA se haya sintetizado por completo. La síntesis de un mRNA procede en la misma dirección que el movimiento de los ribosomas que traduce ese mensaje; es decir, del extremo 5′ al 3′. En consecuencia, tan pronto como una molécula de RNA ha comenzado a producirse, el extremo 5′ está disponible para la unión de los ribosomas. La micrografía en la figura 11-51 muestra el DNA que se transcribe, los mRNA nacientes que se sintetizan, y los ribosomas que están traduciendo cada uno de los mRNA nacientes. Esta única micrografía muestra así todo el dogma central en acción.




**FIGURA 11-51 Visualización de la transcripción y la traducción.** Micrografía electrónica de porciones de un cromosoma de *E. coli* involucrado en la transcripción. El DNA se ve como líneas débiles que corren a lo largo de la foto, mientras que las hebras de mRNA nacientes se ven unidas en uno de sus extremos, presumiblemente por una molécula de RNA polimerasa. Las partículas asociadas con los RNA nacientes son ribosomas en el acto de la traducción; en las bacterias, la transcripción y la traducción ocurren simultáneamente. Las moléculas de RNA aumentan de longitud a medida que aumenta la distancia desde el sitio de inicio.

FUENTE: Oscar L. Miller, Jr., Barbara A. Hamkalo, y CA Thomas. *Science* 1970;169:392; © 1970, reimpreso con permiso de AAAS.

**REPASO**

1. ¿Qué es un polirribosoma? ¿Cómo difiere su formación en procariotas y eucariotas?



# 11.20 VÍAS EXPERIMENTALES

## El papel del RNA como catalizador

La investigación en bioquímica y biología molecular a través de la década de 1970 había solidificado nuestra comprensión de las funciones de las proteínas y los ácidos nucleicos. Las proteínas fueron los agentes que hicieron que las cosas sucedieran en la célula, y las enzimas las que aceleraron las velocidades de las reacciones químicas dentro de los organismos. Los ácidos nucleicos, por otro lado, fueron las moléculas de información en la célula, que almacenan instrucciones genéticas en su secuencia de nucleótidos. La división del trabajo entre las proteínas y los ácidos nucleicos parecía tan bien definida como cualquier distinción que se hubiera hecho en las ciencias biológicas. Más tarde, en 1981, se publicó un documento que comenzó a difuminar esta distinción.[1]

Thomas Cech y sus colaboradores de la Universidad de Colorado habían estado estudiando el proceso mediante el cual el precursor de RNA ribosómico sintetizado por el protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* se convirtió en moléculas maduras de rRNA. El pre-rRNA de *T. thermophila* contenía un intrón de aproximadamente 400 nucleótidos, que tuvieron que ser extirpados del transcripto primario antes de que los segmentos contiguos pudieran unirse (ligarse).

Cech había encontrado previamente que los núcleos aislados de las células podían sintetizar el precursor pre-rRNA y llevar a cabo toda la reacción de corte y empalme. Las enzimas de empalme aún no se habían aislado de ningún tipo de célula, y parecía que *Tetrahymena* podría ser un buen sistema pa-

ra estudiar estas enzimas. El primer paso fue aislar el precursor pre-rRNA en un estado intacto, y determinar el número mínimo de componentes nucleares que se tuvieron que agregar a la mezcla de reacción para obtener un empalme exacto. Se descubrió que cuando los núcleos aislados se incubaron en un medio que contenía una baja concentración de cationes monovalentes (5 mM $NH_4^+$), se sintetizó la molécula de pre-rRNA, pero el intrón no se dividió. Esto permitió a los investigadores purificar el precursor intacto, que planearon utilizar como sustrato para evaluar la actividad de empalme en extractos nucleares. Sin embargo, encontraron que cuando el precursor purificado se incubaba por sí mismo a concentraciones más altas de $NH_4^+$ en presencia de $Mg^{2+}$ y un fosfato de guanosina (p. ej., GMP o GTP), el intrón era insertado desde el precursor (obsérvese **FIGURA 1**).[1] El análisis de secuencia de nucleótidos confirmó que el RNA pequeño que había sido separado del precursor era el intrón, con un nucleótido que contenía guanina añadido en su extremo 5′. Se demostró que el nucleótido adicional se deriva del GTP que se añadió a la mezcla de reacción.

La inserción o empalme de un intrón es una reacción complicada, que requiere el reconocimiento de las secuencias que lindan con el intrón, la división de los enlaces fosfodiéster en ambos lados del intrón, y la ligadura de los fragmentos contiguos. Se han hecho todos los esfuerzos para eliminar cualquier proteína que pueda estar aferrándose al RNA antes de que se haya probado su capacidad de experimentar un empalme. El RNA se había extraído con fenol-detergente, se centrifugó a través de un gradiente y se trató con una enzima proteolítica. Había sólo dos explicaciones razonables: o bien el corte y empalme se realizaba mediante una proteína que estaba unida muy estrechamente al RNA, o bien la molécula pre-rRNA era capaz de empalmarse a sí misma. Esta última idea no fue fácil de aceptar.

Para resolver la cuestión de la presencia de un contaminante proteico, Cech y colaboradores utilizaron un sistema artificial que posiblemente no podría contener proteínas nucleares empalmantes.[2] El DNA que codifica el precursor del rRNA se sintetizó en *E. coli*, se purificó, y se usó como plantilla para la transcripción *in vitro* mediante una RNA polimerasa bacteriana purificada. El pre-rRNA sintetizado *in vitro* se purificó e incubó por sí mismo en presencia de iones monovalentes y divalentes, y un compuesto de guanosina. Debido a que el RNA nunca había estado en una célula, posiblemente no podría estar contaminado por enzimas de empalme celular. Sin embargo, el pre-rRNA aislado experimentó la reacción de corte y empalme preciso que se habría producido en la célula. El RNA tuvo que haberse empalmado a sí mismo.

Como resultado de estos experimentos, se demostró que el RNA es capaz de catalizar una reacción compleja de múltiples pasos. Los cálculos indicaron que la reacción se había acelerado aproximadamente 10 mil millones de veces por encima de la velocidad de la reacción no catalizada. Por tanto, al igual que una enzima proteínica, el RNA era activo en pequeñas concentraciones y podía acelerar en gran medida una reacción química. La distinción primaria entre este RNA y las "enzimas proteícas estándar" fue que el RNA actuaba sobre sí mismo en lugar de sobre un sustrato independiente. Cech llamó al RNA "ribozima".

En 1983 se descubrió un segundo ejemplo no relacionado de catálisis con RNA.[3] Sidney Altman de la Universidad de Yale, y Norman Pace del Hospital Nacional Judío de Denver, colaboraron en el estudio de la ribonucleasa P, una enzima involucrada en el procesamiento de un precursor de RNA de transferencia en bacterias. La enzima era inusual por estar compuesta tanto de proteína como de RNA. Cuando se incubó en buffers con altas concentraciones de $Mg^{2+}$ (60 mM), se encontró que la subunidad de RNA purificada podía eliminar el extremo 5′ del precursor de tRNA (carril 7, consúltese **FIGURA 2**), tal como lo habría hecho

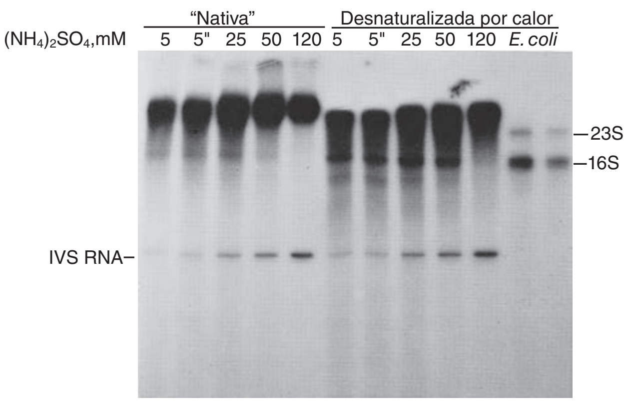



**FIGURA 1 El RNA ribosomal de *Tetrahymena* marcado con $^{32}P$ purificado, transcripto a diferentes concentraciones de $(NH_4)_2SO_4$, se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.** Los números en la parte superior indican la concentración de sulfato de amonio. Se muestran dos grupos de muestras, "nativas" y desnaturalizadas por calor. Las muestras del último grupo se hirvieron durante cinco minutos en un buffer y se enfriaron en hielo, para disociar cualquier molécula que pudiera mantenerse unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Las dos columnas de la derecha contienen rRNA bacterianos 16S y 23S, que proporcionan marcadores de tamaño conocido con los que se pueden comparar las otras bandas en el gel. A partir de las posiciones de las bandas se puede observar que a medida que aumenta la concentración de sulfato de amonio aparece la presencia de un pequeño RNA, cuyo tamaño es igual al del intrón aislado (IVS [*intervening sequence*], secuencia intermedia). Estos datos proporcionaron la primera indicación de que el rRNA podía escindir el intrón sin la ayuda de factores adicionales.

FUENTE: TR Cech, *et al*. *Cell* 27:488, 1981; con el permiso de Elsevier.

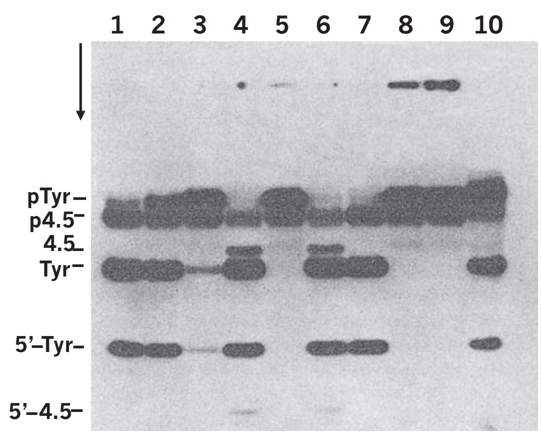



**FIGURA 2 Resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida de las mezclas de reacción que contenían el precursor del tirosinil-tRNA (pTyr) y el precursor de otro RNA denominado RNA 4.5S (p4.5).** Nos centraremos sólo en el pTyr, que normalmente se procesa mediante ribonucleasa P en dos moléculas de RNA, Tyr y 5′-Tyr (que es el extremo 5′ del precursor). Las posiciones en las que estos tres RNA (pTyr, Tyr y 5′-Tyr) migran durante la electroforesis se indican a la izquierda del gel. El carril 1 muestra los RNA que aparecen en la mezcla de reacción cuando el pTyr (y el p4.5) se incuban con la ribonucleasa completa P. Muy poco del pTyr permanece en la mezcla; se ha convertido en los dos productos (Tyr y 5′-Tyr). El carril 5 muestra los RNA que aparecen en la mezcla de reacción cuando se incuba pTyr con el componente de proteína purificado de la ribonucleasa P. La proteína no muestra capacidad para escindir el precursor del tRNA, como se evidencia por la ausencia de bandas donde los dos productos migrarían. Por el contrario, cuando el pTyr se incuba con el componente de RNA purificado de la ribonucleasa P (carril 7), el pTyr se procesa con tanta eficiencia como si se hubiera usado la ribonucleoproteína intacta.

FUENTE: Cecilia Guerrier-Tokada, *et al*. *Cell* 1983;35:850; con permiso de Elsevier.

(*continúa*)

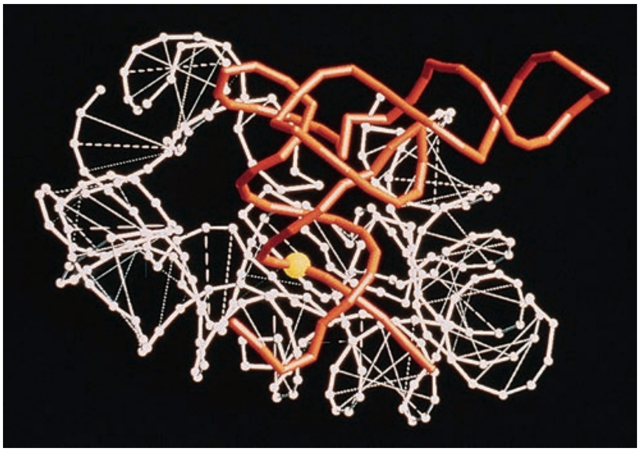


**FIGURA 3 Modelo molecular de una porción de la subunidad catalítica de RNA de la ribonucleasa bacteriana P (blanco) y su sustrato unido, tRNA precursor (rojo).** El sitio en el tRNA precursor donde se produce la escisión por la ribozima está indicado por una esfera amarilla. Es interesante observar que la RNAa P en las mitocondrias humanas es una enzima proteínica y no requiere un componente de RNA para la actividad catalítica. Esta enzima RNAa P mitocondrial es presumiblemente un ejemplo de la absorción evolutiva de una actividad catalítica por una proteína de un RNA antiguo.

FUENTE: Cortesía de Michael E. Harris y Norman R. Pace.

toda la molécula de ribonucleasa P dentro de la célula. Los productos de reacción de la reacción *in vitro* incluyeron la molécula procesada de tRNA maduro. Por el contrario, la subunidad de proteína aislada de la enzima carecía de actividad catalítica (carril 5, véase figura 2).

Para eliminar la posibilidad de que una proteína contaminante catalizara realmente la reacción, la porción de RNA de la ribonucleasa P se sintetizó *in vitro* a partir de una plantilla de DNA recombinante. Al igual que con el RNA que se había extraído de las células bacterianas, este RNA sintetizado artificialmente, sin proteína alguna añadida, era capaz de escindir con precisión el precursor del tRNA.[4] A diferencia de la enzima de procesamiento del rRNA estudiada por Cech, el RNA del ribonucleótido P actuó en otra molécula como sustrato en lugar de en sí misma. Por tanto, se demostró que las ribozimas tienen las mismas propiedades catalíticas que las enzimas proteicas. En la **FIGURA 3** se muestra un modelo de interacción entre la subunidad de RNA catalítico de la ribonucleasa P y un sustrato de tRNA precursor.

La demostración de que el RNA podía catalizar reacciones químicas creó la atmósfera adecuada para reinvestigar una vieja pregunta: ¿Qué componente de la subunidad ribosomal grande es la peptidil transferasa, es decir, el catalizador para la formación del enlace peptídico? Durante la década de 1970, una serie de hallazgos independientes plantearon la posibilidad de que los RNA ribosómicos podrían estar haciendo algo más que actuar como un andamio para mantener las proteínas ribosomales en la posición adecuada para catalizar la traducción. Los siguientes datos se incluían entre las evidencias.

1. Ciertas cepas de *E. coli* portan genes que codifican proteínas asesinas de bacterias llamadas colicinas. Se sabe que una de estas toxinas, la colicina E3, inhibe la síntesis de proteínas en células bacterianas sensibles. Los ribosomas que se habían aislado de las células tratadas con colicina E3 parecían perfectamente normales según la mayoría de los criterios, pero no podían soportar la síntesis de proteínas *in vitro*. El análisis adicional de tales ribosomas reveló que el defecto reside en el rRNA, no en las proteínas ribosomales. La colicina divide el RNA 16S de la subunidad pequeña en unos 50 nucleótidos de su extremo 3′, lo que hace que la subunidad entera no pueda soportar la síntesis de proteínas.[5]
2. El tratamiento de grandes subunidades ribosomales con ribonucleasa $T_1$, una enzima que escinde los enlaces entre los nucleótidos de RNA accesibles, destruyó la capacidad de la subunidad para llevar a cabo la reacción de peptidil transferasa.[6]
3. Una amplia variedad de estudios sobre antibióticos que inhibieron la formación de enlaces peptídicos, incluyendo cloranfenicol, carbomicina y eritromicina, sugirieron que estos medicamentos actúan sobre el RNA ribosómico, no sobre la proteína. Por ejemplo, se descubrió que los ribosomas se volvieron resistentes a los efectos del cloranfenicol como resultado de las sustituciones en las bases en el RNA ribosómico.[7]
4. Se demostró que los RNA ribosómicos tienen una secuencia de bases altamente conservada, mucho más que las secuencias de aminoácidos de las proteínas ribosomales. Algunas de las regiones de los RNA ribosomales prácticamente no se modifican en los ribosomas aislados de procariotas, plantas y animales, así como en los ribosomas aislados de mitocondrias y cloroplastos. El hecho de que las secuencias de rRNA estén tan altamente conservadas sugiere que las moléculas tienen un papel crucial en la función del ribosoma.[8,9] De hecho, un documento de 1975 de CR Woese y colaboradores afirma: "Dado que existe poca o ninguna correlación entre estas regiones conservadas y los sitios de unión a proteínas ribosomales conocidos, es fuerte la implicación de que grandes áreas del RNA están directamente involucradas en la función ribosomal".[8]

La investigación de los roles de los RNA ribosomales se intensificó después de que los laboratorios de Cech y Altman realizaran el descubrimiento de los RNA catalíticos. Una serie de estudios desarrollados por Harry Noller y sus colegas de la Universidad de California, en Santa Cruz, identificaron el sitio en el RNA ribosomal que reside en el centro peptidil transferasa, o alrededor de este.[9] En un estudio se demostró que los RNA de transferencia unidos al ribosoma protegen bases específicas, en el rRNA de la subunidad grande, del ataque de agentes químicos específicos. La protección contra el ataque químico es evidencia de que el tRNA debe estar situado muy cerca de las bases de rRNA que están blindadas.[10] La protección se pierde si se elimina el extremo 3′ del tRNA (el extremo con el CCA enlazado al aminoácido). Este es el final del tRNA implicado en la formación del enlace peptídico, que se esperaría que residiera muy cerca del sitio de la peptidil transferasa.

Los intentos de atribuir una función particular al RNA ribosomal aislado siempre tuvieron fallas. Se suponía que, incluso si los RNA ribosómicos tenían funciones específicas, la presencia de proteínas ribosomales probablemente fuese necesaria para mantener los rRNA en su conformación adecuada. Teniendo en cuenta que las proteínas ribosomales y rRNA han coevolucionado durante miles de millones de años, se espera que las dos moléculas sean interdependientes. A pesar de esta expectativa, el poder catalítico del rRNA aislado fue finalmente demostrado por Noller y colaboradores en 1992.[11] En su trabajo con ribosomas particularmente estables de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive a altas temperaturas, Noller trató las preparaciones de la gran subunidad ribosomal con una proteína-extractora detergente (SDS), una enzima degradadora de proteínas (proteinasa K), y varias rondas de fenol, un desnaturalizador de proteínas. Juntos, estos agentes eliminaron al menos 95% de la proteína de la subunidad ribosomal y se dejó atrás el rRNA. La mayoría del restante 5% de la proteína que permaneció asociada con el rRNA mostró contener pequeños fragmentos de las proteínas ribosomales. Sin embargo, a pesar de la eliminación de casi toda la proteína, el rRNA retenía 80% de la actividad peptidil transferasa de la subunidad intacta. La actividad catalítica fue bloqueada por cloranfenicol y por tratamiento con ribonucleasa. Cuando el RNA se sometió a tratamientos adicionales para eliminar la pequeña cantidad de proteína restante, la preparación perdió su actividad catalítica. Debido a que es muy poco probable que la proteína restante tenga alguna importancia catalítica, se acordó en general que estos experimentos demostraron que la actividad peptidil transferasa del ribosoma se lleva a cabo mediante una ribozima.

La confirmación final de esta conclusión aguardaba los resultados obtenidos por los estudios cristalográficos de rayos X. Como podría esperarse de la complejidad de las subunidades ribosomales, la obtención de cristales de alta calidad de tales partículas fue un esfuerzo muy difícil. Los mayores éxitos en este campo fueron obtenidos por Ada Yonath y sus colegas del Instituto Weizmann en Israel, que habían recurrido al uso de ribosomas preparados a partir de extremófilos procarióticos (página 13) que vivían en aguas de alta temperatura o alta salinidad. Los esfuerzos en el análisis cristalográfico de rayos X de las subunidades ribosomales finalmente culminaron con la publicación en 2000 de estructuras cristalinas de alta resolución de: 1) la gran subunidad ribosomal de *Haloarcula marismortui*, una arqueobacteria que vive en el Mar Muerto, por Thomas Steitz, Peter Moore, y sus colegas en la Universidad de Yale;[12] y 2) la subunidad 30S de la bacteria termofílica, ***Thermus thermophilus***, por Venkatraman Ramakrishnan y sus colegas en la Universidad de Cambridge[13] y por Ada Yonath y colegas en Alemania e Israel.[14] Las estructuras de alta resolución del ribosoma completo —tanto bacterianas como eucarióticas— están ahora disponibles, lo que permite determinar los cambios dinámicos en la estructura ribosomal-sustrato en diferentes etapas del proceso de traducción.[15] La pregunta clave, una vez que estas estructuras fueron resueltas, fue si algunos aminoácidos de las proteínas ribosomales estarían posicionados para catalizar la reacción de transferencia del peptidilo. Para identificar el sitio de la peptidil transferasa dentro de la gran subunidad ribosomal, Steitz y sus colegas remojaron los cristales de estas subunidades con CCdA-fosfato-puromicina, una sustancia que inhibe la formación del enlace peptídico al unirse estrechamente al sitio activo de la peptidil transferasa. La determinación de la estructura de estas subunidades a resolución atómica revela la ubicación del inhibidor unido, y por tanto la ubicación del sitio peptidil transferasa.[16] Sorprendentemente en ese momento, se encontró que el inhibidor del sitio activo está unido dentro de una hendidura de la subunidad que está rodeada por completo por restos de nucleótidos conservados del rRNA 23S. De hecho, no hay una sola hebra lateral de aminoácidos de ninguna de las proteínas ribosomales en aproximadamente 18 Å del sitio donde se sintetiza un enlace peptídico. Este resultado pareció demostrar de una vez por todas que el ribosoma es una ribozima. No obstante, como en muchos otros ejemplos de la biología molecular, uno debe tener cuidado antes de llegar a conclusiones definitivas. Los estudios cuidadosos de mutagénesis de todos los nucleótidos de rRNA 23S localizados cerca del sitio de transferencia del peptidilo no mostraron un efecto fuerte sobre la catálisis, lo que sugiere que el RNA 23S podría no participar directamente en la catálisis[17], una conclusión respaldada por análisis de modelado molecular. Pero si ni las proteínas ribosomales ni el RNA ribosómico participan directamente en la catálisis, ¿quién lo hace? El grupo 2′-OH del residuo A76 del tRNA del sitio P (el último residuo de la hebra, contenido en el motivo CCA), se encuentra muy cerca del grupo alfa amina tRNA aminoacil del sitio A, y los experimentos donde el residuo A76 se reemplaza por derivados deoxi 2′, sugiere que este residuo ciertamente desempeña un papel catalítico importante.[18] Los residuos 23S rRNA parecen jugar un papel, esencialmente en el posicionamiento de los sustratos para una mejor catálisis[17], lo que sugiere que el ribosoma es un banco de trabajo basado en el RNA en el que el tRNA es capaz de catalizar la formación de enlaces peptídicos. Un aspecto inicialmente confuso de los experimentos que muestran un papel para el A76 2′-OH fue que la diferencia en la eficacia de transferencia de peptidilo entre un A76 normal y uno 2′deoxi era mucho mayor de lo que se predeciría para un simple efecto catalítico químico del grupo OH. Esta paradoja se resolvió mediante el descubrimiento de que el 2′-OH del residuo del tRNA A76 parece jugar un papel en la estabilización de la conformación del sitio activo del RNA ribosómico, de modo que al menos parte del efecto de reemplazar el A76 con un 2′ deoxi derivado se debió a que la conformación del sitio de transferencia peptidilo del ribosoma se volvió inestable.[19]

## Referencias


1. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*. *Cell* 1981;27:487-496.
2. Kruger K, *et al*. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 1982;31:147-157.
3. Guerrier-Tokada C, *et al*. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983;35:849-857.
4. Guerrier-Tokada C, *et al*. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vitro*. *Science* 1984;223:285-286.
5. Bowman CM, *et al*. Specific inactivation of 16S ribosomal RNA produced by colicin E3 *in vivo*. *Proc Nat' l Acad Sci USA* 1971;68:964-968.
6. Cerna J, Rychlik I, Jonak J. Peptidyl transferase activity of *Escherichia coli* ribosomes digested by ribonuclease T1. *Eur J Biochem* 1975;34:551-556.
7. Kearsey S, Craig IW. Altered ribosomal RNA genes in mitochondria from mammalian cells with chloramphenicol resistance. *Nature* 1981;290:607-608.
8. Woese CR, *et al*. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1975;254:83-86.
9. Noller HF, Woese CR. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 1981;212:403-411.
10. Moazed D, Noller HF. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* 1989;57:585-597.
11. Noller HF, Hoffarth V, Zimniak L. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 1992;256:1416-1419.
12. Ban N, *et al*. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution. *Science* 2000;289:905-920.
13. Wimberly BT, *et al*. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 2000;407:327-339.
14. Schluenzen F, *et al*. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 A resolution. *Cell* 2000;102:615-623.
15. Ramakrishnan V. The ribosome emerges from a black box. *Cell* 2014;159:979-84.
16. Nissen P, *et al*. The structural basis of ribosome activity in pep tide bond synthesis. *Science* 2000;289:920-930.
17. Leung EKY, *et al*. The mechanism of peptidyl transfer catalysis by the ribosome. *Annu Rev Biochem* 2011;80:527-555.
18. Weinger JS, *et al*. Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:1101-6.
19. Zaher HS, *et al*. The 2′-OH group of the peptidyl-tRNA stabilizes an active conformation of the ribosomal PTC. *EMBO J* 2011;30:2445-2453.

# Preguntas analíticas



1. Mire el diagrama de codones de la figura 11-38. ¿Qué codones esperaría que tengan un tRNA único, es decir, uno que se usa sólo para ese codón? ¿Por qué muchos codones no tienen su propio tRNA único?
2. La proflavina es un compuesto que se inserta en el DNA y causa mutaciones de marco de lectura (página 447). ¿Cómo diferiría el efecto en la secuencia de aminoácidos de una mutación inducida por la proflavina entre un código superpuesto y uno no superpuesto?
3. Se acaba de aislar un nuevo medicamento que tiene sólo un efecto sobre el metabolismo celular; inhibe totalmente la descomposición del pre-rRNA a RNA ribosómico. Después de tratar un cultivo de células de mamíferos con este medicamento, se da a las células [$^3$H]uridina durante 2 minutos y luego estas crecen en presencia del medicamento, en un medio sin marcar, durante 4 horas antes de extraer el RNA y centrifugarlo a través de un gradiente de sacarosa. Dibuje las curvas que se obtendrían al trazar la absorbancia a 260 nm y la radiactividad contra el número de fracción del gradiente. Etiquete la abscisa (eje *X*) usando los valores S de RNA.
4. Con los mismos ejes que en la pregunta anterior, dibuje el perfil del RNA radiactivo que obtendría después de que un cultivo de células mamíferas se haya incubado durante 48 horas en [$^3$H] uridina sin la presencia de algún fármaco inhibidor.
5. Suponga que debe construir un RNA sintético a partir de un dinucleótido repetitivo (p. ej., AGAGAGAG) y luego usar este RNA como un mensajero para sintetizar un polipéptido en un sistema de síntesis de proteína *in vitro*, como el utilizado por Nirenberg y Matthaei para producir polifenilalanina. ¿Qué tipo de polipéptido se produciría a partir de este polinucleótido en particular? ¿Se esperaría tener más de un tipo de polipéptido producido? ¿Por qué sí, o por qué no?
6. Suponga que encontró una enzima que incorporó nucleótidos aleatoriamente en un polímero sin el requisito de una plantilla. ¿Cuántos codones diferentes se podrían encontrar en los RNA sintetizados preparados con dos precursores de nucleótidos diferentes (p. ej., CTP y ATP)? (Una enzima llamada polinucleótido fosforilasa cataliza este tipo de reacción y se usó en estudios que identificaron codones).
7. Dibuje las partes de una 15S globina pre-mRNA y marque las porciones no codificantes.
8. ¿Cuál es la cantidad mínima de GTP que se necesitaría para sintetizar un pentapéptido en una bacteria?
9. En la página 437 se sugirió que los cambios de codones sinónimos por lo general no alteran el fenotipo de un organismo. ¿Puede usted pensar en una ocasión en la que esto no sea cierto? ¿Qué dice esto acerca de los requisitos de codificación del material genético?
10. ¿Estaría de acuerdo con la siguiente declaración? El descubrimiento de que la anemia de células falciformes resultó de un solo cambio de aminoácidos fue una prueba de que el código genético no se solapaba. ¿Por qué sí, o por qué no?
11. La talasemia es una enfermedad caracterizada por mutaciones que convierten codones de aminoácidos en codones de parada. Suponga que debe comparar los polipéptidos sintetizados *in vitro* a partir de mRNA purificados de una amplia variedad de pacientes con talasemia. ¿Cómo espera que se comparen estos polipéptidos? Consulte el diagrama de codones de la figura 11-38; ¿cuántos codones de aminoácidos se pueden convertir en codones de parada mediante una única sustitución de bases?
12. ¿Cree usted que sería teóricamente posible tener un código genético con sólo dos letras, A y T? Si es así, ¿cuál sería el número mínimo de nucleótidos necesarios para hacer un codón?
13. En la página 430 se informan experimentos que condujeron a la síntesis de ribozimas con propiedades catalíticas únicas. En 2001 se aisló una ribozima artificial que era capaz de incorporar hasta 14 ribonucleótidos en el extremo de un RNA existente, utilizando una hebra de RNA como plantilla. La ribozima podría usar cualquier secuencia de RNA como plantilla, e incorporaría nucleótidos complementarios en la hebra de RNA recién sintetizada con una precisión de 98.5%. Si usted fuera un ponente de un antiguo mundo RNA, ¿cómo usaría este hallazgo para argumentar su caso? ¿Esto probaría la existencia de un antiguo mundo RNA? Si no, ¿qué piensa usted que proporcionaría la evidencia más sólida para un mundo así?
14. ¿Cómo es posible que la síntesis de mRNA ocurra a un ritmo mayor en las células bacterianas que en cualquier otra clase, a pesar de que hay muy poco mRNA presente en la célula? Intente escribir una ecuación que describa la concentración en el estado estacionario del mRNA en términos de la velocidad de transcripción y la velocidad de descomposición del mRNA. Supongamos que el mRNA se produce a una velocidad constante y que el mRNA se descompone a una velocidad proporcional a su concentración. (Consúltese **video tutorial cuantitativo**).
15. Si un codón para la serina es 5′-AGC-3′, el anticodón para este triplete sería 5′– – – 3′ (escriba los nucleótidos sobre las líneas). ¿Cómo afectaría el fenómeno de oscilación a esta interacción codón-anticodón?
16. Uno de los principales argumentos de que las proteínas evolucionaron antes que el DNA (es decir, que el mundo del RNA evolucionó hacia un mundo de RNA-proteína en lugar de un mundo de RNA-DNA) se basa en el hecho de que la maquinaria de traducción involucra una gran variedad de RNA (p. ej., tRNA, rRNA) mientras que la maquinaria de transcripción no muestra evidencia de involucración de RNA. ¿Puede explicar cómo tal argumento sobre las etapas de la evolución temprana podría estar basado en estas observaciones?
17. Las mutaciones de cambio de marco y las mutaciones sin sentido se describieron en las páginas 447 y 448. Se observó que las mutaciones sin sentido a menudo conducen a la destrucción por NMD de un mRNA que contiene un codón de terminación prematuro. ¿Esperaría que los mRNA que contienen mutaciones de marco de lectura estén sujetos a NMD?
18. Las puntas de flecha en la figura 11-14 indican la dirección de la transcripción de los diversos genes de tRNA. ¿Qué le dice este dibujo sobre la actividad de la plantilla de cada hebra de una molécula de DNA dentro de un cromosoma?
19. Los genes por lo general se descubren al encontrar un fenotipo anormal resultante de una mutación genética. Alternativamente, a menudo se pueden identificar mediante el examen de la secuencia de DNA de un genoma. ¿Por qué se supone que los genes que codifican los miRNA no se descubrieron hasta hace muy poco?
20. Recientemente se ha descubierto que bajo condiciones de estrés los ribosomas pueden agregar aminoácidos al extremo de las hebras de proteínas en crecimiento, con independencia del mRNA. Cuando la traducción se detiene en las eucariotas, la pequeña subunidad ribosomal se disocia y se lleva el mRNA. La gran subunidad, que contiene la naciente cadena peptídica, une dos proteínas llamadas Rqc2 y Ltn1 que median el reclutamiento directo del tRNA cargado con alanina y treonina, lo que provoca que la cadena peptídica continúe creciendo mediante la adición de alanina y treonina. ¿Esta capacidad del ribosoma para agregar aminoácidos con independencia del mRNA contradice la hipótesis del mundo RNA? ¿El hecho de que este alargamiento sea independiente del mRNA significa que es independiente de todo el RNA? ¿Qué desafíos enfrentaría un escenario de “mundo proteína” en comparación con un mundo RNA, en términos de poder propagar información de secuencia específica?

CAPÍTULO 12

# Control de la expresión genética

## ¿PODEMOS RECREAR UN T-REX?

En la película *Parque Jurásico*, los científicos aislaron DNA de dinosaurios, a partir de mosquitos preservados en ámbar que se habían alimentado de estos reptiles, y lo insertaron en el genoma de un huevo de lagarto. Los genes de dinosaurios causaron que los lagartos se desarrollaran como dinosaurios. En realidad, no es posible obtener cantidades significativas de DNA de dinosaurio de muestras antiguas en ámbar, pero incluso si se pudiera lograr que los genes de dinosaurios se expresen y regulen de forma adecuada en un genoma de lagarto es un desafío extraordinario. Como se verá en este capítulo, la expresión genética está controlada por una gran cantidad de elementos de DNA en el genoma, y la inserción de un gen en un sitio aleatorio en el genoma a menudo da como resultado un gen que se expresa incorrectamente, si es que se expresa en absoluto. Además de sus aplicaciones hipotéticas en la reencarnación de dinosaurios, el control de la expresión genética también es importante en el mundo real, por ejemplo, en estudios que intentan corregir defectos genéticos implantando versiones normales del gen defectuoso en el genoma de un paciente (terapia genética).



Mosquito preservado en ámbar

FUENTE: © Museo de Historia Natural/Alamy Inc.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**12.1** Control de la expresión genética en las bacterias

**12.2** Estructura de la envoltura nuclear

**12.3** Empaquetado del genoma eucariota

**12.4** Heterocromatina

**12.5** Estructura de un cromosoma mitótico

**12.6** **PERSPECTIVA HUMANA:** Aberraciones cromosómicas y trastornos humanos

**12.7** Epigenética: hay más para heredar que DNA

**12.8** El núcleo como un organelo organizado

**12.9** Descripción general de la regulación genética en eucariotas

**12.10** Generación de perfiles de la actividad genética

**12.11** Papel de los factores de transcripción en la regulación de la expresión genética

**12.12** Estructura de los factores de transcripción

**12.13** Sitios de DNA implicados en la regulación de la transcripción

**12.14** Ejemplo de activación transcripcional: el receptor de glucocorticoides

**12.15** Activación transcripcional: el papel de los potenciadores, promotores y coactivadores

**12.16** Activación transcripcional de polimerasas pausadas

**12.17** Represión transcripcional

**12.18** Control del procesamiento de RNA

**12.19** Control transduccional

**12.20** Papel de los microRNA en el control transduccional

**12.21** Control postraduccional: determinación de la estabilidad de la proteína

# 12.1 Control de la expresión genética en las bacterias



A pesar de sus obvias diferencias en forma y función, las células que componen un organismo multicelular contienen un conjunto idéntico de genes. La información genética presente en todas las células se puede comparar con un libro de planos proyectados para la construcción de un edificio grande y polivalente. En diferentes momentos, se necesitarán todos los planos, pero sólo se consulta un pequeño subconjunto mientras se trabaja en un piso o sala en particular. Así mismo, un óvulo fertilizado contiene un conjunto completo de instrucciones genéticas que se replica con fidelidad y se distribuye a cada célula de un organismo en desarrollo, pero sólo un subconjunto de genes se expresa en cualquier célula en particular. Los organismos unicelulares, como las bacterias y los protistas, también contienen un conjunto completo de genes, pero únicamente un subconjunto se expresa en algún momento, según las señales ambientales o las fuentes de alimentos. Por tanto, las células de todos los organismos portan mucha más información genética de la que utilizarán en una circunstancia determinada. Las células poseen mecanismos que les permiten regular con precisión su información genética, expresando genes sólo cuando son necesarios. Se cree que los cambios en la expresión genética desempeñan un papel fundamental en la evolución, al permitir que los genes normalmente activos en una parte del embrión se activen en una región diferente, lo que lleva a un nuevo patrón de desarrollo para producir un nuevo organismo. En muchas enfermedades se observan cambios en la expresión genética, sobre todo en el cáncer, y en la actualidad, el 10% de todos los fármacos recetados, incluidos los análogos de hormonas esteroides, actúan en el ámbito de la expresión genética. En este capítulo, se examinarán algunas de las formas en que las células procariotas y eucariotas controlan la expresión genética y, de ese modo, aseguran que ciertos RNA y proteínas se sinteticen, mientras que otros no. Gran parte de lo que se conoce sobre el control de la expresión genética se basa en estudios que investigan un gen único en diferentes circunstancias. Sin embargo, con el advenimiento de las nuevas tecnologías y la secuenciación de genomas completos, se empieza a comprender cómo se regula todo el repertorio de genes expresados.

## Organización de genomas bacterianos

Los genomas procariotas se organizan de varias maneras diferentes, pero los genomas de DNA de cadena doble circulares tienen una disposición común. Para estos organismos, casi no hay exceso de DNA; casi todo el DNA codifica RNA o proteínas con poco espacio entre unidades de transcripción individuales. Además, los genes involucrados en el mismo proceso biológico a menudo se agrupan para permitir la regulación coordinada de todo el grupo. Por ejemplo, puede haber un conjunto de genes implicados en la formación de flagelos directamente adyacentes a un grupo de genes que participan en el metabolismo del azúcar. Debido a esta disposición, es esencial que las decisiones sobre dónde y cuándo comenzar y detener la transcripción o la traducción estén reguladas con precisión.

## El operón bacteriano

Una célula bacteriana vive en contacto directo con su entorno, el cual puede cambiar drásticamente en composición química o temperatura de un momento a otro. En ciertas circunstancias, puede estar presente una fuente alimenticia particular, mientras que otras veces ese compuesto está ausente. Considere las consecuencias de transferir un cultivo de bacterias de un medio mínimo a uno que contenga 1) lactosa o 2) triptófano.

1. La lactosa es un disacárido (véase figura 2-16) compuesto por glucosa y galactosa, cuya oxidación puede proporcionar a la célula intermediarios metabólicos y energía. El primer paso en el catabolismo (es decir, la degradación) de la lactosa es la hidrólisis del enlace que une los dos azúcares (enlace β-galactósido), una reacción catalizada por la enzima β-galactosidasa. Cuando las células bacterianas crecen en condiciones mínimas, las células no necesitan β-galactosidasa. En condiciones mínimas, una célula promedio contiene menos de cinco copias de β-galactosidasa y una única copia del mRNA correspondiente. A los pocos minutos de agregar lactosa al medio de cultivo, las células contienen aproximadamente 1 000 veces el número de moléculas de β-galactosidasa. La presencia de lactosa ha inducido la síntesis de esta enzima (**FIGURA 12-1**).
2. El triptófano es un aminoácido requerido para la síntesis de proteínas. En los humanos, el triptófano es un aminoácido esencial; debe provenir de la dieta. Por el contrario, las células bacterianas pueden sintetizar triptófano en una serie de reacciones que requieren la actividad de múltiples enzimas. Las células que crecen en ausencia de triptófano activan los genes que codifican estas enzimas. Sin embargo, si el triptófano llegara a estar disponible en el medio, las células ya no tendrían que sintetizar este aminoácido y, en pocos minutos, se repriría la producción de las enzimas necesarias para sintetizar el triptófano.

En las bacterias, los genes que codifican las enzimas necesarias para sintetizar triptófano se agrupan en el cromosoma en un complejo funcional llamado **operón**. Todos los genes de un operón son controlados de manera coordinada por un mecanismo

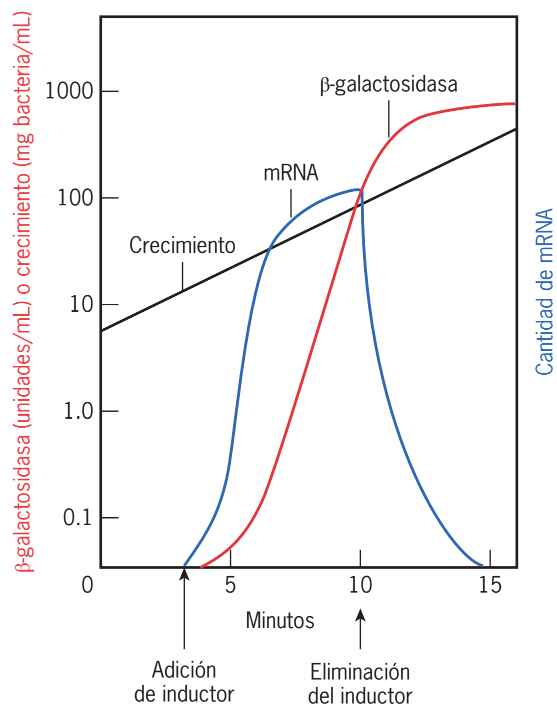



**FIGURA 12-1 Cinética de la inducción de β-galactosidasa en *E. coli*.** Cuando se añade un β-galactósido como la lactosa a un cultivo de estas bacterias, la producción de mRNA para la enzima β-galactosidasa comienza muy rápidamente, seguida, en un minuto más o menos, por la aparición de la proteína, cuya concentración aumenta con rapidez. La eliminación del inductor conduce a una caída precipitada en el nivel del mRNA, lo que refleja su rápida degradación. La cantidad de enzima se nivela, porque las nuevas moléculas ya no se sintetizan.

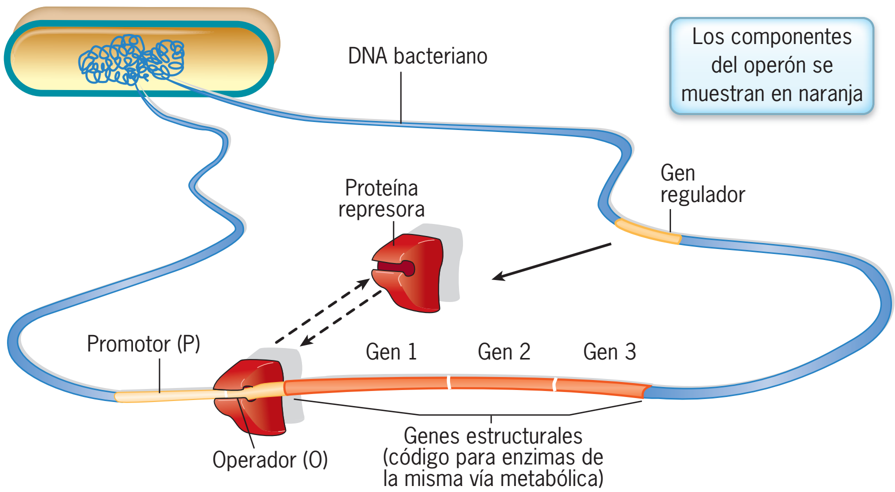



**FIGURA 12-2 Organización de un operón bacteriano.** Las enzimas que componen una vía metabólica están codificadas por una serie de genes estructurales que residen en una matriz contigua dentro del cromosoma bacteriano. Los genes estructurales de un operón se transcriben en un único mRNA policistrónico, que se traduce en polipéptidos separados. La transcripción de los genes estructurales está controlada por una proteína represora que se sintetiza mediante un gen regulador, que también es parte del operón. Cuando se une al sitio operador del DNA, la proteína represora bloquea el movimiento de la RNA polimerasa desde el promotor hasta los genes estructurales.

que Francois Jacob y Jacques Monod, del Instituto Pasteur en París, describieron por primera vez en 1961. Un operón bacteriano típico consiste en genes estructurales, una región promotora, una región operadora y un gen regulador (**FIGURA 12-2**).

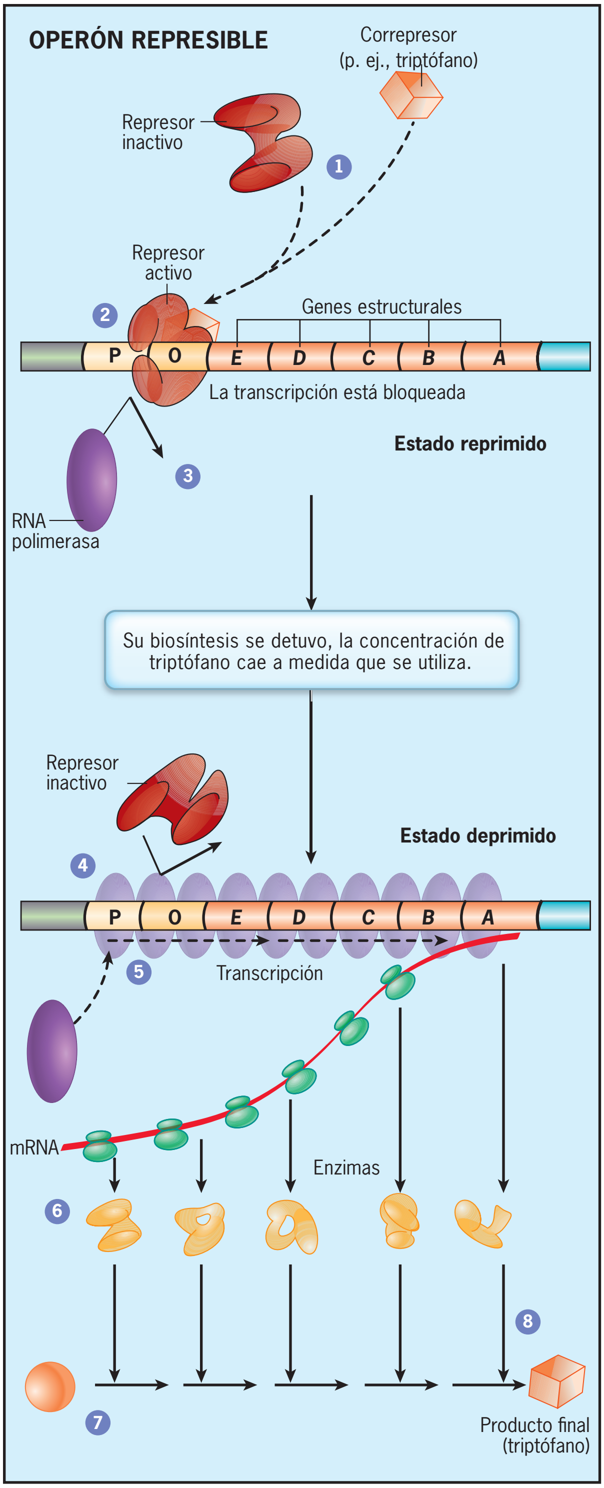
- Los **genes estructurales** codifican las enzimas ellos mismos. Los genes estructurales de un operón generalmente se encuentran adyacentes entre sí, y la RNA polimerasa se mueve de un gen estructural al siguiente, transcribiendo todos los genes en un único mRNA. Un mRNA que contiene información para más de un polipéptido se llama mRNA *policistrónico*. El mRNA policistrónico se traduce luego en las diversas enzimas individuales de la vía metabólica.
- El **promotor** es el sitio donde la RNA polimerasa se une al DNA antes de comenzar la transcripción (se discute en la página 408).
- **El operador** normalmente reside adyacente o se solapa con el promotor (véase figura 12-4) y sirve como el sitio de unión para una proteína, por lo general un *represor*. El represor es un ejemplo de *proteína reguladora del gen*, una proteína que reconoce una secuencia específica de pares de bases dentro del DNA y que se une a esa secuencia con alta afinidad. Como será indudable en las secciones restantes de este capítulo, las proteínas de unión a DNA, como los represores bacterianos, desempeñan un papel destacado en la determinación de si se transcribe o no un segmento particular del genoma.
- El **gen regulador** codifica la proteína represora.

La clave para la expresión del operón radica en la secuencia del operador y la presencia o ausencia de un represor. Cuando el represor se enlaza con el operador (**FIGURA 12-3**), impide que la RNA polimerasa inicie la transcripción. La capacidad del represor para unirse al operador e inhibir la transcripción depende de la conformación del represor, que se regula alostéricamente mediante un compuesto clave en la ruta metabólica, la lactosa o el triptófano. Es la concentración de esta sustancia metabólica clave lo que determina si el operón está activo o inactivo en cualquier momento dado.

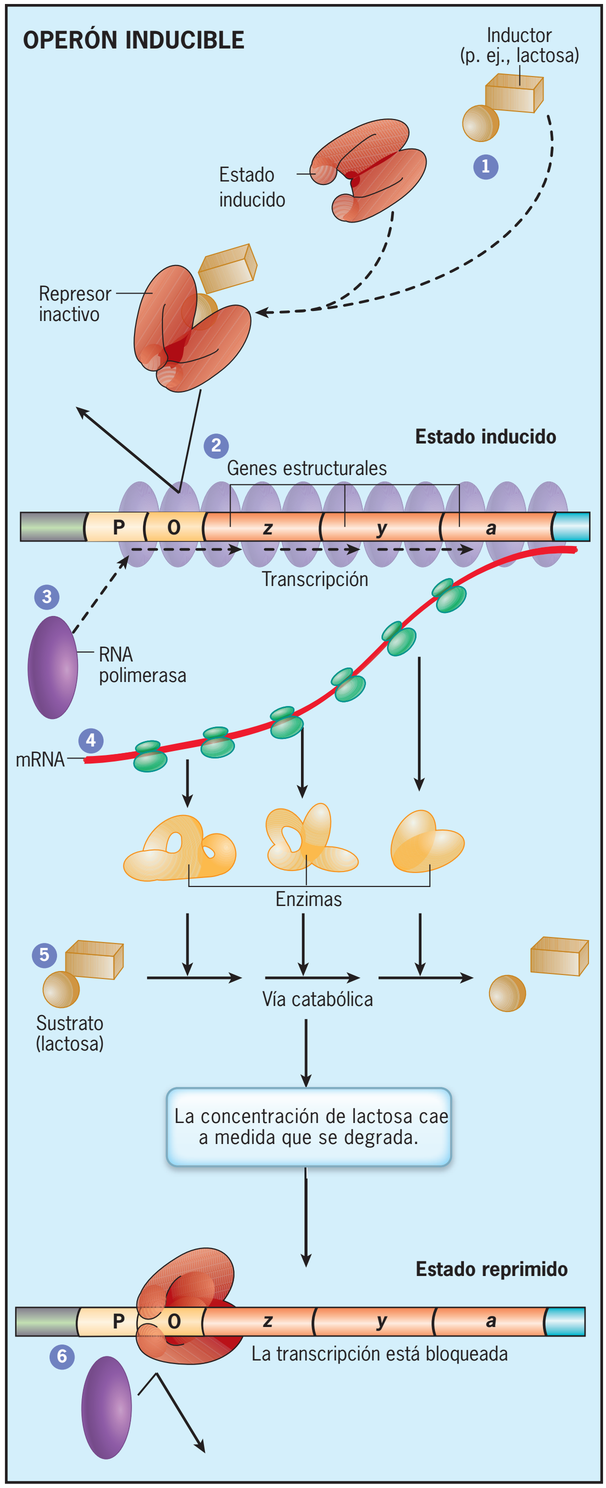
**EL OPERÓN TRP** En un operón *reprimible*, como el operón triptófano (o *trp*), el represor no puede unirse al operador DNA por sí mismo. En cambio, el represor es activo como una proteína de enlace de DNA sólo cuando forma complejo con un factor específico, como el triptófano (figura 12-3*a*), que funciona como un *correpresor*. En ausencia de triptófano, la conformación del represor no permite la unión a la secuencia del operador, lo que permite que la RNA polimerasa se una al promotor y transcriba los genes estructurales del operón *trp*, lo que conduce a la producción de las enzimas que sintetizan triptófano. Una vez que el triptófano está disponible, las enzimas de la vía biosintética del triptófano ya no son necesarias. En estas condiciones, la mayor concentración de triptófano conduce a la formación del complejo triptófano-represor, que se une al operador y bloquea la transcripción.

**EL OPERÓN LAC** El operón lac es un conjunto de genes que regula la producción de las enzimas necesarias para degradar la lactosa en las células bacterianas. El operón *lac* es un ejemplo de un **operón inducible**, en el que la presencia de una sustancia metabólica clave (en este caso, lactosa) induce la transcripción del operón, lo que permite la síntesis de las proteínas codificadas por los genes estructurales (figura 12-3*b*). El operón *lac* contiene tres genes estructurales en tándem: el gen z, que codifica β-galactosidasa; el gen y, que codifica la galactosidasa permeasa, una proteína que promueve la entrada de lactosa en la célula; y el gen α, que codifica la tiogalactósido transacetilasa, una enzima cuyo papel fisiológico no está claro. Si la lactosa está presente en el medio, el disacárido entra a la célula a través de cantidades limitadas de galactósido permeasa, donde se une al represor lac, cambiando la conformación del represor y haciéndolo incapaz de unirse al DNA del operador. Esto libera RNA polimerasa para transcribir el operón, seguido de la traducción de las tres proteínas codificadas. Por tanto, en un operón inducible, la proteína represora se une al DNA sólo en ausencia de lactosa, que funciona como **inductor**.[1] A medida que disminuye la concentración de lactosa en

[1] El inductor real es la alolactosa, que se deriva y difiere de la lactosa por el tipo de enlace que une los dos azúcares. Esta característica se ignora en la discusión.




a)




b)

**FIGURA 12-3 Regulación genética por operones.** Los operones inducibles y reprimibles funcionan según un principio similar: si el represor es capaz de unirse al operador, los genes se desactivan; si el represor se inactiva y es incapaz de unirse al operador, los genes se expresan. *a*) En un operón reprimible, como el operón trp, el represor, por sí solo, no puede unirse al operador, y los genes estructurales que codifican las enzimas se transcriben activamente. Las enzimas del operón trp catalizan una serie de reacciones que dan como resultado la síntesis del aminoácido esencial triptófano. (1) Cuando el triptófano es abundante, las moléculas de triptófano actúan como correpresores al unirse al represor inactivo y (2) cambiar su forma, lo que les permite unirse al operador, (3) de modo que impiden la transcripción de los genes estructurales. Por tanto, cuando la concentración de triptófano es alta, el operón se reprime, evitando la sobreproducción de triptófano. (4) Cuando la concentración de triptófano es baja, las moléculas represoras carecen de un correpresor y, por consiguiente, no se unen al operador, permitiendo la transcripción (5) y la traducción (6) de las enzimas (7) necesarias para sintetizar triptófano (8). *b*) En un operón inducible, (1) el inductor (en este caso, el disacárido lactosa) se une a la proteína represora y (2) evita su unión al operador (O). (3) Sin el represor en la vía, la RNA polimerasa se une al promotor (P) y transcribe los genes estructurales. De esta manera, cuando la concentración de lactosa es alta, se induce el operón y se transcriben y traducen las enzimas que digieren el azúcar codificadas por el operón lac (4). A medida que el azúcar se metaboliza (5), su concentración disminuye, haciendo que las moléculas del inductor unido se disocien del represor, que luego recupera su capacidad de unirse al operador y evitar la transcripción (6). Por tanto, cuando la concentración del inductor es baja, el operón se reprime, lo que impide la síntesis de enzimas innecesarias.

el medio, el disacárido se disocia de su sitio de unión en la molécula represora, lo cual permite que el represor se una nuevamente al operador y reprima la transcripción.

**REPRESIÓN CATABÓLICA** Los represores, como los de los operones *lac* y *trp*, ejercen su influencia mediante el control negativo, ya que la interacción del DNA con esta proteína inhibe la expresión genética. El operón lac también está bajo *control positivo*, como se descubrió durante una investigación temprana de un fenómeno llamado el *efecto de la glucosa*. Si las células bacterianas se abastecen con glucosa, así como con una variedad de otros sustratos, como lactosa o galactosa, las células catabolizan primero la glucosa e ignoran los otros azúcares. La glucosa en el medio actúa para reprimir la producción de diversas enzimas catabólicas, tales como β-galactosidasa, que permitirían la utilización de los otros azúcares. En 1965, se realizó un descubrimiento sorprendente: se detectó AMP cíclico (cAMP), que anteriormente se pensaba que estaba involucrado sólo en el metabolismo eucariota, en células de *E. coli*. Se encontró que la concentración de cAMP en las células estaba relacionada con la presencia de glucosa en el medio; cuanto mayor es la concentración de glucosa, menor es la concentración de cAMP. Además, cuando se añadió cAMP al medio en presencia de glucosa, las enzimas catabólicas que normalmente estaban ausentes fueron sintetizadas de manera repentina por las células.

Aunque el mecanismo exacto por el cual la glucosa disminuye la concentración de cAMP aún no se ha dilucidado, sí se comprende bien el mecanismo por el cual cAMP supera el efecto de la glucosa. El cAMP actúa en las células procariotas uniéndose a una proteína, la *proteína receptora de cAMP* (CRP, *cAMP receptor protein*). La CRP no puede unirse al DNA por sí misma. Sin embargo, el complejo cAMP-CRP reconoce y se une a un sitio específico en la región de control de *lac* (**FIGURA 12-4**). La presencia del cAMP-CRP unido provoca un cambio en la conformación del DNA, lo que hace posible que la RNA polimerasa transcriba el operón *lac*. El sitio de unión en el promotor del operón lac para RNA polimerasa no es un sitio de unión de alta afinidad, por lo que el inicio de la transcripción es extremadamente ineficiente, excepto en presencia del complejo cAMP-CRP. Incluso cuando está presente la lactosa y el represor lac está inactivado, la RNA polimerasa no puede transcribir el operón lac, a menos que los niveles de cAMP-CRP sean altos. Debido a la relación inversa entre los niveles de cAMP y los niveles de glucosa, la transcripción del operón lac está así regulada por los niveles de glucosa. Siempre que la glucosa sea abundante, las concentraciones de cAMP permanecerán por debajo de las requeridas para promover la transcripción del operón.

**ATENUACIÓN** Debido a que el represor *trp* sólo puede unir al operador en presencia de triptófano, la concentración de triptófano sirve como un regulador de retroalimentación que controla la transcripción del operón. Una segunda forma de regulación de retroalimentación controla el operón *trp* regulando la terminación de la transcripción, un mecanismo denominado *atenuación*. En presencia de altas concentraciones de triptófano, la RNA polimerasa cesa la transcripción poco después del inicio en una región llamada secuencia líder. Si la concentración de triptófano es baja, la transcripción no termina hasta que se transcribe el operón completo. El mecanismo de atenuación vincula estructuras secundarias de RNA alternativas a la terminación de la transcripción. Inmediatamente después de la transcripción, el RNA de la región líder se pliega en una de las dos estructuras secundarias alternativas. Una de estas estructuras es una señal de terminación de la transcripción que impide que la RNA polimerasa continúe hasta el final del operón. La estructura alternativa no contiene una señal de terminación de la transcripción y permite la transcripción de un solo mRNA que codifica todos los genes estructurales. La decisión en cuanto a cuál de las dos estructuras de RNA alternativas se formó, está regulada por la concentración de triptófano.

## Riboswitches

En los últimos años, un tipo diferente de mecanismo ha captado el interés de los investigadores que estudian la regulación de genes bacterianos. Las proteínas como los represores *lac* y *trp* no son las únicas moléculas reguladoras de genes que están influidas por la interacción con metabolitos pequeños. Se han identificado varios mRNA bacterianos que pueden unirse a un pequeño metabolito, como la glucosamina o la adenina, con notable especificidad. El metabolito se une a una región 5′ no codificante altamente estructurada del mRNA. Una vez que se unen al metabolito, estos mRNA, o **riboswitches**, como se les llama, experimentan un cambio en su conformación plegada que les permite alterar la expresión de un gen implicado en la producción de ese metabolito. Así, los riboswitches actúan por medio de un mecanismo de retroalimentación similar a las estructuras de RNA alternativas que regulan la atenuación en el operón *trp*. La mayoría de los riboswitches suprimen la expresión genética, al bloquear la terminación de la transcripción o el inicio de la traducción. Al

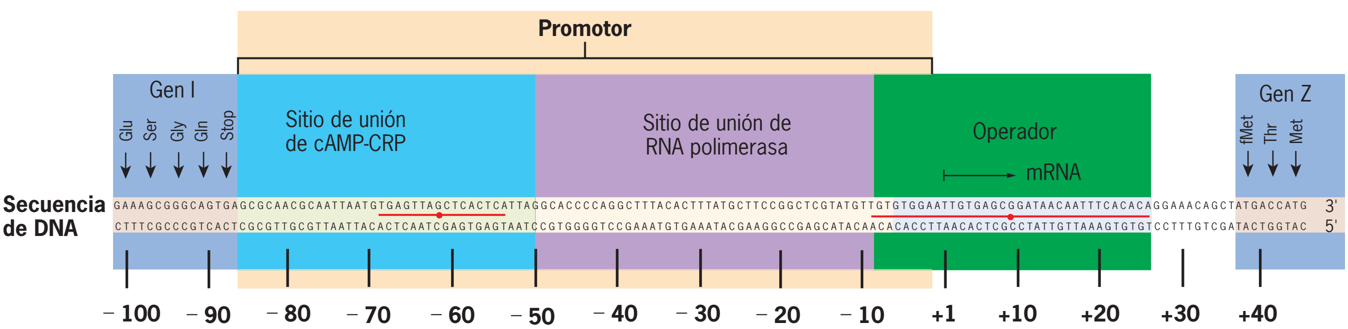



**FIGURA 12-4 Secuencia de nucleótidos de las regiones de control del operón *lac*.** El sitio de unión para la subunidad sigma de la RNA polimerasa (p. 411) es un sitio de unión de baja afinidad en el operón *lac*. La transcripción del operón es altamente ineficiente, excepto en presencia de un complejo entre cAMP y la proteína CRP. Debido a que la concentración de cAMP es inversamente proporcional a los niveles de glucosa, el operón lac no se activará, a menos que los niveles de glucosa sean bajos. El sitio de inicio de la transcripción se denota como +1, que está alrededor de 40 nucleótidos corriente arriba del sitio en el que se inicia la traducción. Las regiones de simetría de secuencia en el sitio de CRP y el operador se indican mediante la línea roja horizontal.

FUENTE: Tomado de RC Dickson, *et al*. *Science* 1975;187:32; Copyright 1975, reimpreso con permiso de AAAS.

igual que los represores que funcionan junto con operones, los riboswitches permiten a las células ajustar su nivel de expresión genética en respuesta a los cambios en los niveles disponibles de ciertos metabolitos. Dado que actúan sin la participación de cofactores de proteínas, es probable que los riboswitches sean otro legado de un mundo de RNA ancestral (p. 429).



**REPASO**

1. Describa la cascada de eventos responsables de los cambios repentinos en la expresión genética de una célula bacteriana después de la adición de lactosa. ¿Cómo se compara esto con los eventos que ocurren en respuesta a la adición de triptófano?
2. ¿Cuál es el papel del AMP cíclico en la síntesis de β-galactosidasa?
3. ¿Qué es un riboswitch?

## 12.2 Estructura de la envoltura nuclear

Una diferencia principal entre los organismos procariotas y eucariotas es la presencia de un núcleo en las células eucariotas. Además, la mayoría de los organismos eucariotas tienen genomas mucho más grandes, que están presentes como moléculas de DNA de doble cadena dispuestas en cromosomas lineales que pueden visualizarse con facilidad durante la mitosis (como en la figura 12-22*b*). Antes de examinar la regulación de la expresión genética en eucariotas, primero se analizarán las consecuencias de la compartimentación de los genomas dentro de los núcleos y cómo los grandes genomas se empaquetan en complejos de DNA-proteína llamados **cromatina**. El DNA en organismos procariotas no está empaquetado en cromatina, como resultado, las proteínas de unión a DNA, tales como la RNA polimerasa, los represores y los complejos CRP-cAMP pueden unirse directamente a sus sitios de unión preferidos. En contraste, las proteínas de unión a DNA en eucariotas tienen que encontrar sus sitios de unión preferidos en el contexto de un complicado complejo de DNA-proteína.

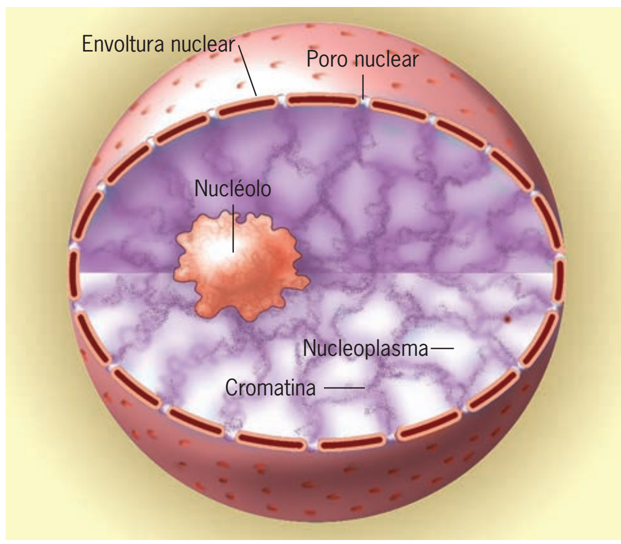
Teniendo en cuenta su importancia en el almacenamiento y la utilización de la información genética, el núcleo de una célula eucariota tiene, a primera vista, una morfología que se distingue bastante poco (**FIGURA 12-5**). Los contenidos del núcleo están presentes como una masa viscosa y amorfa de material encerrada por una *envoltura nuclear* compleja que forma un límite entre el núcleo y el citoplasma. Incluidos dentro del núcleo de una célula de interfase típica (es decir, no mitótica) están 1) los cromosomas, que están presentes como fibras de nucleoproteínas muy extendidas, denominadas *cromatina*; 2) uno o más *nucléolos*, que son estructuras electrodensas de forma irregular que funcionan en la síntesis de RNA ribosómico y el ensamblaje de ribosomas (discutido en la página 413); y 3) el *nucleoplasma*, la sustancia fluida en la que se disuelven los solutos del núcleo.

La separación del material genético de una célula del citoplasma circundante puede ser la característica más importante que distingue a los eucariotas de los procariotas, lo que hace que la aparición de la envoltura nuclear sea un hito en la evolución biológica. La **envoltura nuclear** consiste en dos membranas celulares dispuestas paralelas entre sí y separadas por 10 a 50 nm (**FIGURA 12-6**). Juntas, estas membranas contienen más de 60 proteínas transmembrana distintas, incluidas varias especies que unen la membrana nuclear externa con elementos del citoesqueleto (figura 12-6*a*). Las membranas nucleares inteRNA y exteRNA se fusionan en sitios que forman poros circulares que contienen conjuntos complejos de proteínas. La célula promedio de los mamíferos contiene varios miles de poros nucleares. Por lo general, la membrana externa está tachonada con ribosomas y es continua con la membrana del retículo endoplasmático rugoso. El espacio entre las membranas es continuo con la luz del ER (figura 12-6*a*).

La superficie interna de la envoltura nuclear de las células animales está unida por proteínas de membrana integrales a una red filamentosa delgada, llamada lámina nuclear (**FIGURA 12-7**). La lámina nuclear proporciona soporte mecánico a la envoltura nuclear, sirve como un sitio de unión para las fibras de cromatina en



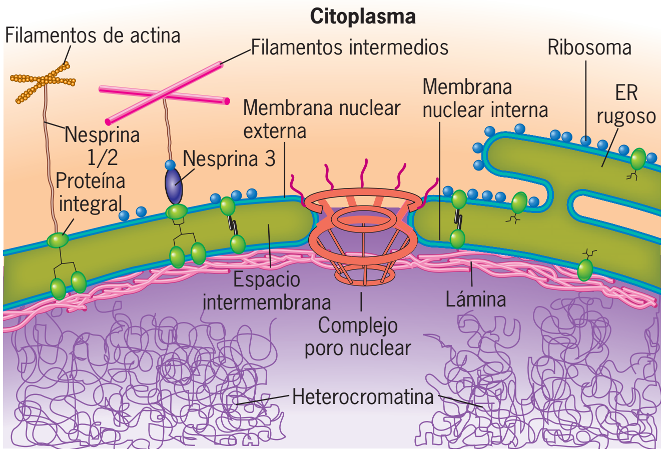

*a*)



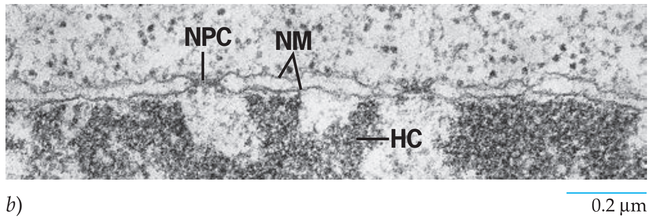

*b*)

**FIGURA 12-5 Núcleo de la célula.** *a*) Micrografía electrónica de un núcleo interfásico de células HeLa. La heterocromatina (p. 469) es evidente alrededor de toda la superficie interna de la envoltura nuclear. Se ven dos nucléolos prominentes, y se pueden observar grupos de cromatina diseminados por todo el nucleoplasma. *b*) Dibujo esquemático que muestra algunos de los principales componentes del núcleo.

FUENTE: *a*) Tomado de Werner W Franke. *Int Rev Cytol* 1974;suppl 4:130, con permiso de Elsevier.




a)



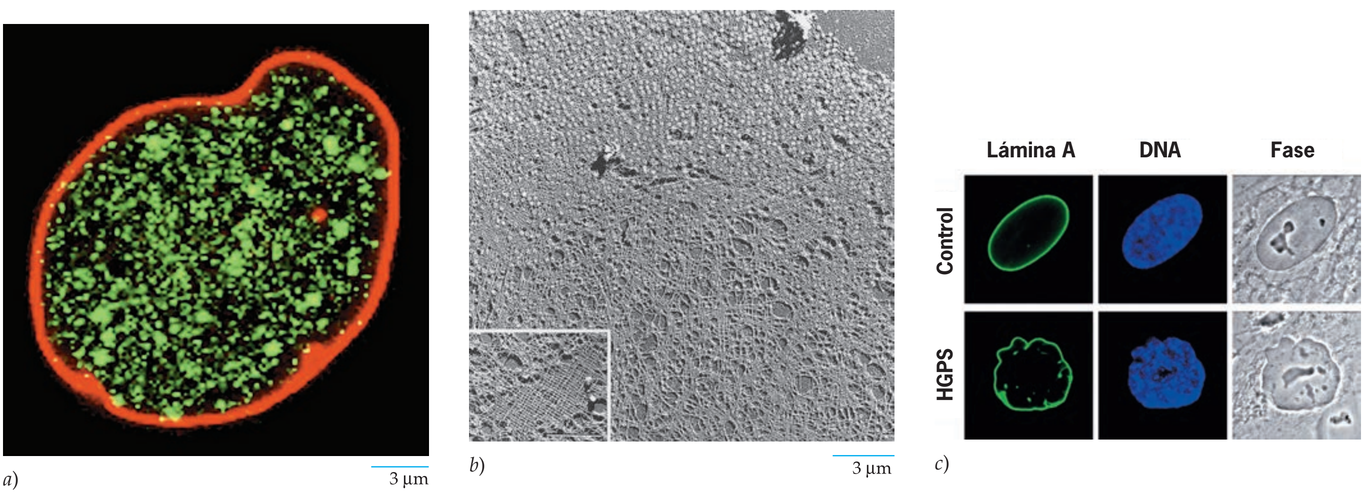

b)

**FIGURA 12-6 Envoltura nuclear.** *a*) Dibujo esquemático que muestra la doble membrana, el complejo de poro nuclear, la lámina nuclear y la continuidad de la membrana externa con el retículo endoplasmático rugoso (ER, *endoplasmic reticulum*). Ambas membranas de la envoltura nuclear contienen su propio complemento distintivo de proteínas. Los filamentos de actina y los filamentos intermedios del citoesqueleto están conectados a la membrana nuclear externa por proteínas fibrosas (nesprinas). *b*) Micrografía electrónica de una sección a través de una porción de la envoltura nuclear de una célula de la punta de la raíz de cebolla. Tenga en cuenta la doble membrana (NM) con espacio intermedio, los complejos de poro nuclear (NPC, *nuclear pore complexes*) y la heterocromatina (HC) asociada que no se extiende a la región de los poros nucleares.

FUENTE: *b*) Tomado de Werner W Franke, *et al*. *J Cell Biol* 1981;91:47s, fig. 8. Reproducido con permiso de The Rockefeller University Press.

la periferia nuclear (figura 12-6*b*) y tiene un papel poco conocido en la replicación y transcripción de DNA. Los filamentos de la lámina nuclear tienen aproximadamente 10 nm de diámetro y están compuestos de polipéptidos, llamados laminillas. Las laminillas son miembros de la misma superfamilia de polipéptidos que se ensamblan en los filamentos intermedios de 10 nm del citoplasma (véase tabla 9-2). El desensamblaje de la lámina nuclear antes de la mitosis se induce por fosforilación de las laminillas.

Las mutaciones en uno de los genes laminares (*LMNA*) son responsables de una serie de diversas enfermedades humanas, entre las que se incluye una forma rara de distrofia muscular (llamada EDMD2), en la que las células musculares contienen núcleos excepcionalmente frágiles. Las mutaciones en LMNA también se han relacionado con una enfermedad, llamada síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS, *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*), que se caracteriza por el envejecimiento prematuro y la muerte durante la adolescencia por un ataque cardiaco o accidente cerebrovascular. La figura 12-7*c*) muestra los núcleos deformados de las células de un paciente con HGPS, lo que demuestra la importancia de la lámina nuclear como determinante de la arquitectura nuclear. Es interesante observar que el fenotipo representado en la figura 12-7*c*) se ha rastreado hasta una mutación sinónima, es decir, una que generó un codón diferente para el mismo aminoácido. En este caso, el cambio en la secuencia de DNA altera la forma en que se empalma la transcripción del gen, lo que lleva a la producción de una proteína acortada, que es lo que causa el fenotipo alterado. Este ejemplo ilustra cómo la secuencia de un gen sirve como un "código múltiple": uno que dirige la maquinaria de traducción y otros que dirigen la maquinaria de empalme y el plegamiento de proteínas.




a) b) c)

**FIGURA 12-7 Lámina nuclear.** *a*) Núcleo de una célula humana cultivada que ha sido teñida con anticuerpos marcados con fluorescencia contra la lámina A/C, para revelar la lámina nuclear (roja), que se encuentra en la superficie interna de la envoltura nuclear. Una proteína que se propone formar parte de una matriz nuclear (o andamiaje nuclear) aparece en verde. *b*) Micrografía electrónica de una envoltura nuclear liofilizada sombreada con metal de un ovocito de *Xenopus* que se ha extraído con el detergente no iónico Tritón X-100. La lámina aparece como una malla bastante continua que comprende filamentos orientados aproximadamente perpendiculares entre sí. El recuadro muestra un área bien conservada a partir de la cual se han eliminado de manera mecánica los poros nucleares. *c*) Estas micrografías muestran el núcleo dentro de un fibroblasto que se había cultivado tanto de un paciente con HGPS (fila inferior) como de un sujeto sano (fila superior). Las células se tiñen para la proteína laminar A (columna izquierda), para DNA (columna central) o se muestran en un estado vivo bajo el microscopio óptico de contraste de fase (columna derecha). El núcleo de la célula del paciente con HGPS se deforma debido a la presencia en la lámina nuclear de una proteína laminar A truncada.

FUENTE: *a*) Tomado de HMa, AJ Siegel y R Berezney. *J Cell Biol* 1999;146:535, fig. 2. Reproducido con permiso de la Rockefeller University Press; *b*) Tomado de U Aebi, J Cohn, L Buhle y L Gerace. *Nature* 1986;323:561. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited; *c*) Tomado de Anna Mattout, *et al*. Cortesía de Yosef Gruenbaum. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:338, con el permiso de Elsevier.

## El complejo de poros nucleares y su papel en el tráfico nucleocitoplasmático

La envoltura nuclear es la barrera entre el núcleo y el citoplasma, y los poros nucleares son las vías de acceso a través de esa barrera. A diferencia de la membrana plasmática, que impide el paso de macromoléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular, la envoltura nuclear es un centro de actividad para el movimiento de RNA y proteínas en ambas direcciones entre el núcleo y el citoplasma. La replicación y la transcripción del material genético dentro del núcleo requieren la participación de un gran número de proteínas que se sintetizan en el citoplasma y se transportan a través de la envoltura nuclear. Por el contrario, los mRNA, los tRNA y las subunidades ribosómicas que se fabrican en el núcleo deben transportarse por medio de la envoltura nuclear en la dirección opuesta. Algunos componentes, como los snRNA del espliceosoma (p. 426), se mueven en ambas direcciones; se sintetizan en el núcleo, se ensamblan en partículas RNP en el citoplasma y luego se envían de vuelta al núcleo donde funcionan en el procesamiento de mRNA. Para apreciar la magnitud del tráfico entre los dos compartimientos celulares principales, considere una célula HeLa, que se estima que contiene alrededor de 10 000 000 de ribosomas. Para apoyar su crecimiento, un solo núcleo de células HeLa debe importar alrededor de 560 000 proteínas ribosómicas y exportar aproximadamente 14 000 subunidades ribosómicas por minuto.

¿Cómo pasan todos estos materiales a través de la envoltura nuclear? En una primera aproximación, se inyectó una suspensión de pequeñas partículas de oro en las células y se observó el paso del material a través de la envoltura nuclear con el microscopio electrónico. Como se ilustra en la **FIGURA 12-8*a*,*b*)**, estas partículas se mueven desde el citoplasma hacia el núcleo, pasando en fila india a través del centro de los poros nucleares. Las micrografías electrónicas de las células fijadas en el curso normal de sus actividades también han demostrado que el material particulado puede pasar a través de un poro nuclear. En la figura 12-8*c*) se muestra un ejemplo, en el que el material granular, que se supone que consiste en una subunidad ribosómica, se ve atravesando uno de estos poros.

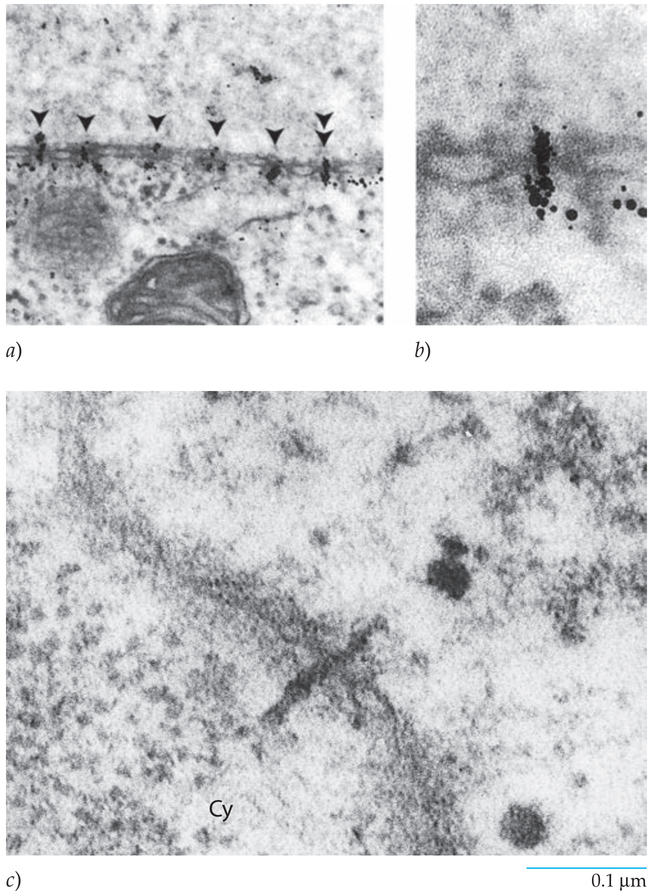



**FIGURA 12-8 Movimiento de materiales a través del poro nuclear.** *a*) Micrografía electrónica del borde nuclear-citoplasmático de un ovocito de rana tomado minutos después de la inyección con partículas de oro que habían sido recubiertas con una proteína que normalmente se encuentra en el núcleo. Estas partículas pasan a través del centro de los poros nucleares (flechas) en su camino desde el citoplasma hasta el núcleo. *b*) A mayor aumento, las partículas de oro se ven agrupadas en una matriz lineal dentro de cada poro. *c*) Micrografía electrónica de una sección a través de la envoltura nuclear de una célula de insecto que muestra el movimiento de material granular (se presume que es una subunidad ribosómica) a través de un poro nuclear.

FUENTE: *a*, *b*) Cortesía de CM Feldherr; *c*) Tomado de Barbara J Stevens y Hewson Swift. *J Cell Biol* 1966;31:72, fig. 23. Reproducido con permiso de Rockefeller University Press.

Dado el hecho de que materiales tan grandes como partículas de oro y subunidades ribosómicas pueden penetrar en los poros nucleares, se podría conjeturar que estos poros son simplemente canales abiertos, pero se trata justamente de lo contrario. Los poros nucleares contienen una estructura en forma de rosquilla llamada **complejo de poros nucleares (NPC)**, que abarca la envoltura nuclear, proyectándose en el citoplasma y el nucleoplasma. El NPC es un complejo supramolecular enorme —de 15 a 30 veces la masa de un ribosoma— que exhibe simetría octagonal debido a que varias estructuras se repiten ocho veces (figura 12-10). A pesar de su considerable tamaño y complejidad, los NPC contienen sólo unas 30 proteínas diferentes, llamadas *nucleoporinas*, que se conservan, en gran medida, entre la levadura y los vertebrados. Cada nucleoporina está presente en múltiples copias —8, 16 o 32 en número— de acuerdo con la simetría octagonal de la estructura.

La estructura del NPC se ve en las micrografías electrónicas de la **FIGURA 12-9** y los modelos de la **FIGURA 12-10**. En el corazón del NPC se encuentra un canal central, que está rodeado por un anillo de nucleoporinas, cuyos reordenamientos pueden cambiar el diámetro de la abertura de, aproximadamente, 20 a 40 nm. El NPC no es una estructura estática, como lo demuestra el hallazgo de que muchas de sus proteínas componentes se reemplazan con nuevas copias en un periodo de segundos a minutos. Estudios recientes sugieren que este intercambio dinámico de nucleoporinas puede desempeñar un papel en la activación de la transcripción de la cromatina que está asociada con el NPC.

Entre las nucleoporinas se encuentra un subconjunto de proteínas que poseen, dentro de su secuencia de aminoácidos, un gran número de fenilalanina-glicina repetidas (FG, por la letra inicial de sus nombres). Las repeticiones de FG se agrupan en una región particular de cada molécula llamada dominio FG. Debido a su composición inusual de aminoácidos, los dominios FG poseen una estructura desordenada (p. 55) que les proporciona una organización flexible y extendida. Se cree que las nucleoporinas que contienen repeticiones de FG recubren el canal central del NPC con sus dominios FG filamentosos que se extienden en el corazón del canal central. Los dominios FG forman una malla, o tamiz, hidrofóbica que bloquea la difusión libre de macromoléculas más grandes (más de aproximadamente 40 000 daltones) entre el núcleo y el citoplasma.

En 1982, Robert Laskey y sus colegas en el Medical Research Council de Inglaterra descubrieron que la nucleoplasmina, una de las proteínas nucleares más abundantes de los ovocitos de anfibios, contiene un tramo de aminoácidos cerca de su terminal C que funciona como una **señal de localización nuclear** (**NLS,** *nuclear localization signal*). Esta secuencia permite que una proteína pase a través de los poros nucleares y entre al núcleo. Las NLS mejor estudiadas o "clásicas" consisten en uno o dos tramos cortos de aminoácidos cargados positivamente. El antígeno T codifi-

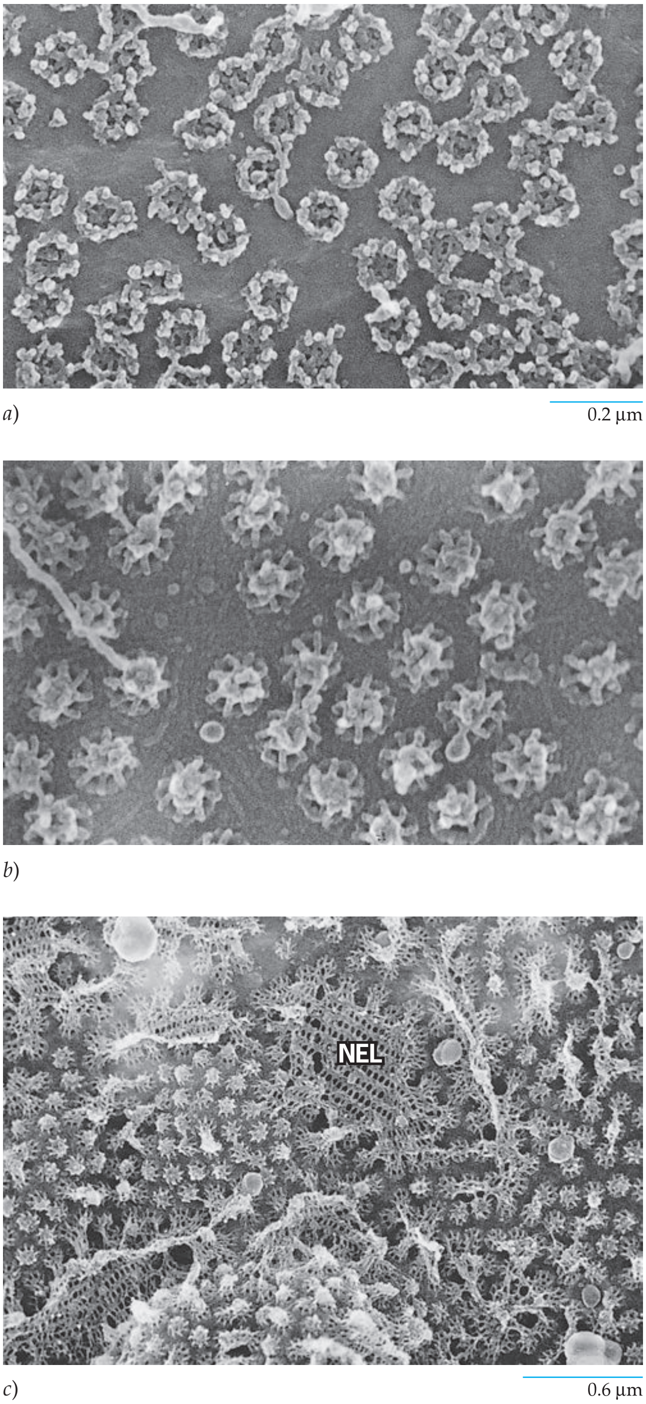



**FIGURA 12-9 Micrografías electrónicas de barrido del complejo de poro nuclear, a partir de envolturas nucleares aisladas de un ovocito anfibio.** *a*) Cara citoplasmática de la envoltura nuclear que muestra el anillo citoplasmático periférico del complejo de poro nuclear. *b*) Cara nuclear de la envoltura nuclear que muestra la apariencia de cesta de la porción interna del complejo. *c*) Cara nuclear de la envoltura que muestra la distribución de los NPC y los lugares donde se conservan los parches intactos de la lámina nuclear (NEL). En todas estas micrografías, envolturas nucleares aisladas se fijaron, se deshidrataron, se secaron y se recubrieron con metal.

FUENTE: *a-c*) Tomado de: MW Goldberg y TD Allen. *J Cell Biol* 1992;119:1431, Figuras 1-3. Reproducido con permiso de Rockefeller University Press.

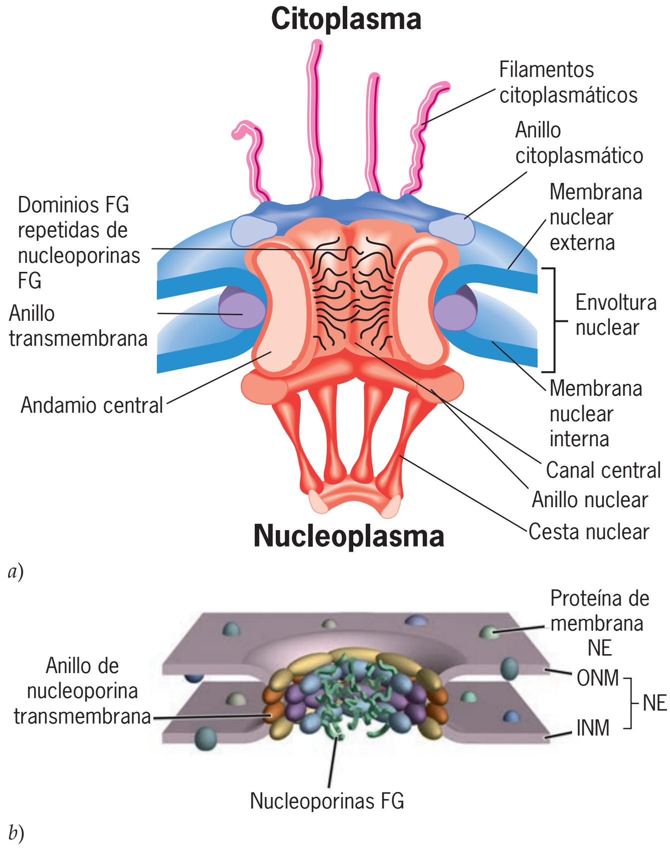


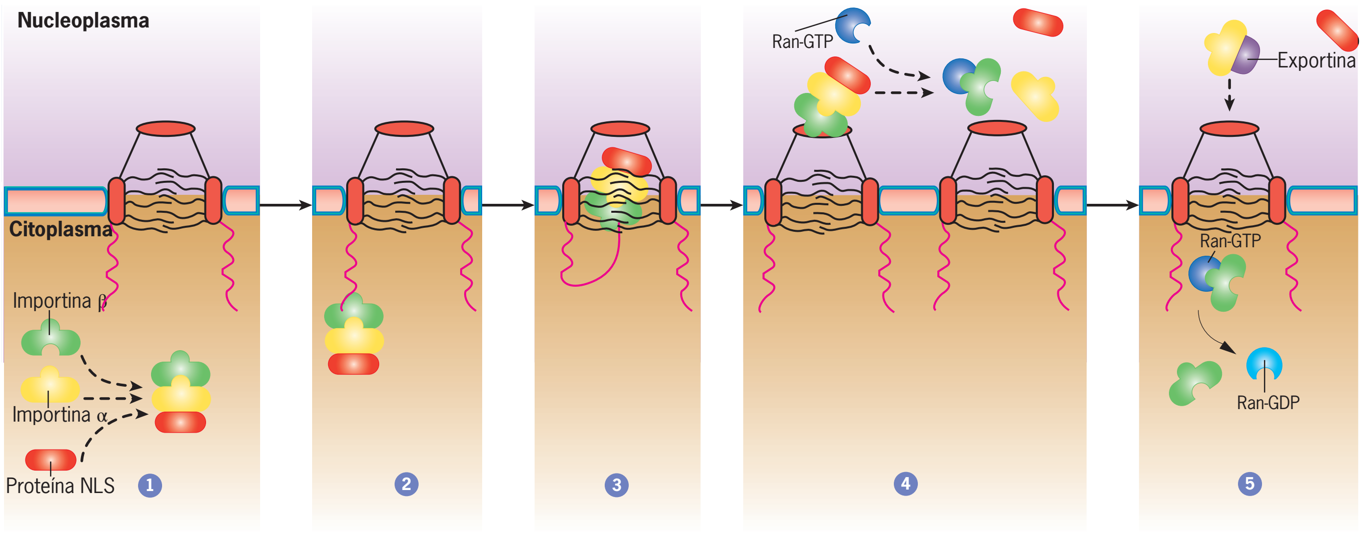

**FIGURA 12-10 Modelo de un complejo de poro nuclear vertebrado (NPC).** *a*) Representación esquemática de un NPC vertebrado como está situado dentro de la envoltura nuclear. Esta elaborada estructura consta de varias partes, incluido un andamio y un anillo transmembrana que ancla el complejo a la envoltura nuclear, un anillo citoplasmático y nuclear, una cesta nuclear y ocho filamentos citoplasmáticos. Las nucleoporinas que contienen FG alinean un canal central con sus dominios desordenados que contienen FG que se extienden dentro de la abertura y forman una malla hidrofóbica. *b*) Reconstrucción tridimensional de una porción de un complejo de poro nuclear que muestra la localización de moléculas de nucleoporinas individuales dentro de la estructura. Las nucleoporinas de FG se muestran en verde. Varias nucleoporinas transmembrana atraviesan la membrana del poro, formando un anillo exterior que ancla el NPC a la envoltura nuclear.

FUENTE: *b*) Tomado de: Javier Fernández-Martínez y Michael P Rout. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:604, con el permiso de Elsevier.

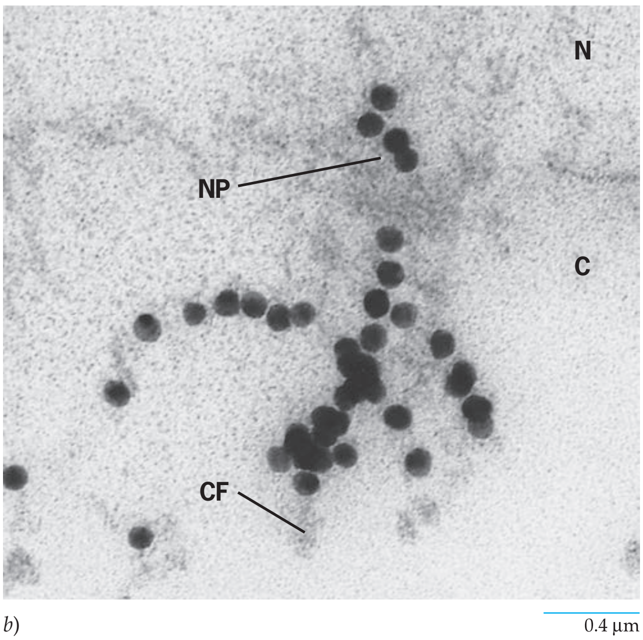
cado por el virus SV40, por ejemplo, contiene una NLS identificada como -Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-. Si uno de los aminoácidos básicos en esta secuencia es reemplazado por un aminoácido no polar, la proteína no se localiza en el núcleo. Por el contrario, si esta NLS se fusiona con una proteína no nuclear, como la albúmina sérica, y se inyecta en el citoplasma, la proteína modificada se concentra en el núcleo. Por tanto, elegir como blanco de las proteínas al núcleo es similar, en principio, al tráfico de otras proteínas que están destinadas a la segregación dentro de un organelo particular, como una mitocondria o un peroxisoma (sección 8.21). En todos estos casos, las proteínas poseen una "dirección" específica que es reconocida por un receptor específico que media su transporte al organelo.

El estudio del transporte nuclear ha sido un área muy activa de investigación, impulsado por el desarrollo de sistemas *in vitro* capaces de importar selectivamente proteínas y RNPs al núcleo. Usando estos sistemas, los investigadores han identificado una familia de proteínas que funcionan como *receptores de transporte móviles*, que transportan macromoléculas a través de la envoltura nuclear. Dentro de esta familia, las *importinas* mueven las macromoléculas del citoplasma al núcleo y las *exportinas* mueven las macromoléculas en la dirección opuesta.

La **FIGURA 12-11*a*)** describe algunos de los principales pasos que ocurren durante la importación nuclear de una proteína, como la nucleoplasmina, que contiene una NLS clásica. La impor-




*a*)




*b*)

**FIGURA 12-11 Importación de proteínas desde el citoplasma al núcleo.** *a*) Pasos propuestos para la importación de proteínas nucleares. Las proteínas que llevan una señal de localización nuclear (NLS) se unen al receptor heterodimérico (importina α/β) (paso 1) formando un complejo que se asocia con un filamento citoplasmático (paso 2). El complejo receptor-carga se mueve a través del poro nuclear (paso 3) y hacia el nucleoplasma, donde interactúa con Ran-GTP y se disocia (paso 4). La subunidad β importina, en asociación con Ran-GTP, se transporta de vuelta al citoplasma, donde se hidroliza Ran-GTP (paso 5). Ran-GDP se transporta posteriormente de vuelta al núcleo, donde se convierte en Ran-GTP. Por el contrario, la importina es transportada de vuelta al citoplasma. *b*) La nucleoplasmina es una proteína presente en alta concentración en el nucleoplasma de los ovocitos de *Xenopus*. Cuando las partículas de oro se recubren con nucleoplasmina y se inyectan en el citoplasma de un ovocito de *Xenopus*, se observa que se unen a los filamentos citoplasmáticos (CF, *cytoplasmic filaments*) que se proyectan desde el anillo exterior del complejo de poro nuclear. Varias partículas también se ven en tránsito a través del poro (NP) en el núcleo.

FUENTE: *a*) Basado en un modelo de M Ohno, *et al*. *Cell* 1998;92:327; Cell by Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización de un libro/libro de texto mediante Copyright Clearance Center; *b*) Tomado de: WD Richardson, *et al*. *Cell* 1988;52:662; con permiso de Elsevier. Cortesía de AD Mills.

tación comienza cuando la proteína de carga que contiene NLS se une a un heterodimérico, receptor soluble de NLS denominado *importina* α/β, que reside en el citoplasma (paso 1, figura 12-11*a*). Se cree que el receptor de transporte escolta la carga de proteína a la superficie externa del núcleo, donde probablemente se acopla con los filamentos citoplasmáticos que se extienden desde el anillo exterior del NPC (paso 2). La figura 12-11*b*) muestra un número de partículas de oro unidas a estos filamentos; estas partículas fueron recubiertas con una proteína nuclear que contiene NLS, que estaba siendo transportada a través del complejo de poro nuclear. El complejo receptor-carga se mueve entonces a través del poro nuclear (paso 3, figura 12-11*a*) participando en una serie de interacciones sucesivas con los dominios FG de las nucleoporinas que contienen FG, permitiendo el paso del complejo receptor-carga a través del NPC.

Una vez que la carga atada avanza a través del NPC, una proteína de unión a GTP llamada **Ran** impulsa la liberación de la proteína transportada al compartimiento nuclear. Al igual que otras proteínas unidas a GTP, como Sar1 (p. 283) y EF-Tu (p. 445) tratadas en capítulos anteriores, Ran puede existir en una forma unida a GTP activa o en una forma inactiva unida a GDP. El papel de Ran en la regulación del transporte nucleocitoplasmático se basa en un mecanismo en el que la célula mantiene una alta concentración de Ran-GTP en el núcleo y una concentración muy baja de Ran-GTP en el citoplasma. El gradiente pronunciado de Ran-GTP a través de la envoltura nuclear depende de la compartimentación de ciertas proteínas accesorias (véase figura 15-21b para análisis adicional). Una de estas proteínas accesorias (llamada RCC1) está secuestrada en el núcleo, donde promueve la conversión de Ran-GDP a Ran-GTP, manteniendo así el alto nivel nuclear de Ran-GTP. Otra proteína accesoria (llamada RanGAP1) reside en el citoplasma, donde promueve la hidrólisis de Ran-GTP a Ran-GDP, manteniendo así el bajo nivel citoplasmático de Ran-GTP. Por tanto, la energía liberada por la hidrólisis de GTP se usa para mantener el gradiente Ran-GTP a través de la envoltura nuclear. Como se verá más adelante, el gradiente Ran-GTP impulsa el transporte nuclear por un proceso que depende únicamente de la difusión mediada por el receptor; no se han implicado proteínas motoras o ATPasas.

Ahora se puede volver a la descripción de la vía clásica de importación NLS. Cuando el complejo de importina-carga llega al núcleo, se encuentra con una molécula de Ran-GTP, que se une al complejo y provoca su desensamblaje, como se indica en el paso 4, figura 12-11*a*). Esta es la función aparente del alto nivel de

Ran-GTP en el núcleo: promueve el desensamblaje de complejos importados del citoplasma. La carga importada se libera en el nucleoplasma, y una parte del receptor NLS (la subunidad β importina) se envía de vuelta al citoplasma junto con el Ran-GTP unido (paso 5). Una vez en el citoplasma, la molécula de GTP unida a Ran se hidroliza, liberando Ran-GDP de la subunidad β importina. La Ran-GDP se devuelve al núcleo, donde se convierte de nuevo al estado GTP-unido para rondas de actividad adicionales. La importina α es transportada de regreso al citoplasma por una de las exportinas.

La Ran-GTP desempeña un papel clave en la escolta de macromoléculas fuera del núcleo, al igual que en su importación desde el citoplasma. Recuerde que Ran-GTP está esencialmente confinada al núcleo. Mientras que Ran-GTP induce el desensamblaje de complejos importados, como se muestra en el paso 4 de la figura 12-11a, Ran-GTP promueve el ensamblaje de complejos de exportación. Las proteínas exportadas desde el núcleo contienen secuencias de aminoácidos (llamadas *señales de exportación nuclear* o *NESs*, *nuclear export signals*), que son reconocidas por los receptores de transporte que las llevan a través de la envoltura nuclear hacia el citoplasma.

### Transporte de RNA

La mayor parte del tráfico del núcleo está formado por varios tipos de moléculas de RNA (mRNA, rRNA, snoRNA, miRNA y tRNA) que se sintetizan en el núcleo y funcionan o se modifican en el citoplasma y vuelven a funcionar en el núcleo. Estos RNA se mueven a través del NPC como ribonucleoproteínas (RNP).

Al igual que con el transporte de proteínas, el de RNA implica la asociación de receptores de transporte que llevan complejos de mRNP a través de poros nucleares. El transporte de un mRNP desde el núcleo al citoplasma está asociado con remodelación extensa; ciertas proteínas se eliminan del mRNA, mientras que otras se agregan al complejo. Numerosos estudios han demostrado un vínculo funcional entre el empalme de premRNA y la exportación de mRNA; sólo los mRNA maduros (es decir, totalmente procesados) son capaces de exportación nuclear. Si un mRNA todavía contiene un intrón sin empalme, ese RNA se retiene en el núcleo.

**REPASO**

1. Describa los componentes que conforman la envoltura nuclear. ¿Cuál es la relación entre las membranas nucleares y el complejo de poro nuclear? ¿Cómo el complejo de poro nuclear regula el movimiento bidireccional de materiales entre el núcleo y el citoplasma?

## 12.3 Empaquetado del genoma eucariota

Los cromosomas parecen surgir de la nada al comienzo de la mitosis y desaparecer una vez más cuando la división celular ha terminado. La aparición y desaparición de los cromosomas proporcionó a los primeros citólogos una pregunta desafiante: ¿cuál es la naturaleza del cromosoma en la célula no mitótica?

Una célula humana promedio contiene aproximadamente 6 400 millones de pares de bases de DNA divididos entre 46 cromosomas (el valor de un número diploide de cromosomas). Cada cromosoma contiene una sola molécula de DNA continua; cuanto más grande es el cromosoma, más DNA contiene. El cromosoma humano más grande contiene ~0.3 mil millones de pares de bases. Dado que cada par de bases tiene una longitud de 0.34 nm, 0.3 mil millones de pares de bases constituirían una molécula de DNA a partir de un solo cromosoma de más de 10 cm de longitud. ¿Cómo es posible colocar los 46 cromosomas en un núcleo que tiene solo 10 µm ($1 \times 10^{-5}$ m) de diámetro y, al mismo tiempo, mantener el DNA en un estado accesible para las enzimas y las proteínas reguladoras? De igual importancia, ¿cómo se organiza la molécula de DNA única de cada cromosoma para que no se enrede irremediablemente con otros cromosomas? Las respuestas se encuentran en la extraordinaria manera en que una molécula de DNA se empaqueta en las células eucariotas.

### Nucleosomas: el nivel más bajo de organización cromosómica

Los cromosomas están compuestos por DNA y proteínas asociadas, llamadas en conjunto *cromatina*. El empaquetado ordenado del DNA eucariota depende de las **histonas**, un grupo notable de proteínas pequeñas que poseen un contenido inusualmente alto de los aminoácidos básicos arginina y lisina. Hay cinco tipos de histonas llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las secuencias de aminoácidos de las histonas, particularmente H3 y H4, han sufrido muy pocos cambios durante largos periodos evolutivos. Las histonas H4 de los guisantes y las vacas, por ejemplo, contienen 102 aminoácidos, y sus secuencias difieren sólo en dos residuos de aminoácidos. ¿Por qué las histonas están tan altamente conservadas? Una razón es que las histonas cargadas positivamente interactúan con la estructura cargada negativamente de la molécula de DNA, que es idéntica en todos los organismos. Además, casi todos los aminoácidos en una molécula de histona participan en una interacción con otra molécula, ya sea DNA u otra histona. Como resultado, muy pocos aminoácidos en una histona pueden reemplazarse por otros aminoácidos sin afectar gravemente la función de la proteína.

A principios de la década de 1970, se descubrió que cuando la cromatina se trataba con nucleasas inespecíficas, la mayoría del DNA se convertía en fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases de longitud. Por el contrario, un tratamiento similar de DNA *desnudo* (es decir, DNA desprovisto de proteínas) producía una población de tamaño aleatorio de fragmentos. Este hallazgo sugirió que el DNA cromosómico estaba protegido del ataque enzimático, excepto en ciertos sitios periódicos a lo largo de su longitud. Se suponía que las proteínas asociadas con el DNA proporcionaban la protección. En 1974, utilizando datos de la digestión con nucleasa y otros tipos de información, Roger Kornberg propuso una estructura completamente nueva para la cromatina. Kornberg expuso que el DNA y las histonas se organizan en subunidades repetitivas, llamadas **nucleosomas**. Ahora se sabe que cada nucleosoma contiene una *partícula nuclear nucleosómica* que consta de 146 pares de bases de DNA superenrollado (p. 381) envuelto casi dos veces alrededor de un complejo en forma de disco de ocho moléculas de histona (**FIGURA 12-12*a***). El núcleo de histona de cada nucleosoma consta de dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 ensambladas en un octámero (**FIGURA 12-13*a***). La histona restante tipo H1 reside fuera de la partícula nuclear del nucleosoma. La histona H1 se conoce como *enlazador histona*, porque se une a una parte del *DNA enlazador* que conecta una partícula nuclear del nucleosoma a la siguiente. Los estudios de fluorescencia indican que las moléculas H1 se disocian y se reasocian continuamente con la cromatina. Juntos, la proteína H1 y el octámero de histona interactúan con unos 168 pares de bases de DNA. Las moléculas de histona H1 pueden eliminarse selectivamente de las fibras de cromatina sometiendo la preparación a soluciones de baja fuerza iónica. Cuando se observa cromatina depletada de H1 bajo el microscopio electrónico, la partícula nuclear del nucleosoma y el DNA desnudo enlazador pueden verse como elementos separados, que juntos aparecen como "perlas en un collar" (figura 12-12*b*).

La comprensión del empaquetamiento de DNA ha avanzado mucho gracias a las imágenes de la partícula nuclear del nucleo-

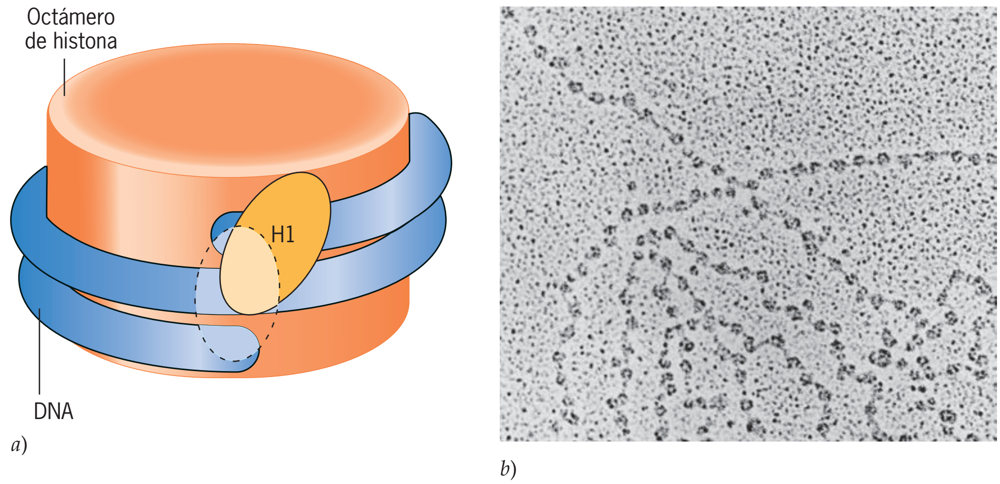



**FIGURA 12-12 Organización nucleosomal de la cromatina.** *a*) Diagrama esquemático que muestra la estructura de una partícula nuclear de nucleosoma y una molécula de histona H1 asociada. La nuclear en sí misma consiste en, aproximadamente, 1.8 vueltas (146 pares de bases) de DNA negativamente superenrollado envuelto alrededor de ocho moléculas de histona nuclear (dos de cada una de H2A, H2B, H3 y H4). El enlazador histona H1 se une cerca de los sitios donde el DNA entra y sale del nucleosoma. Se muestran dos posiciones alternativas de la molécula H1. *b*) Micrografía electrónica de fibras de cromatina liberadas del núcleo de una célula de *Drosophila*. Las partículas nucleares del nucleosoma tienen un diámetro de alrededor de 10 nm y están conectadas por cadenas cortas de DNA desnudo enlazador, que tienen cerca de 2 nm de diámetro.

FUENTE: *b*) Cortesía de Oscar L Miller, Universidad de Virginia.

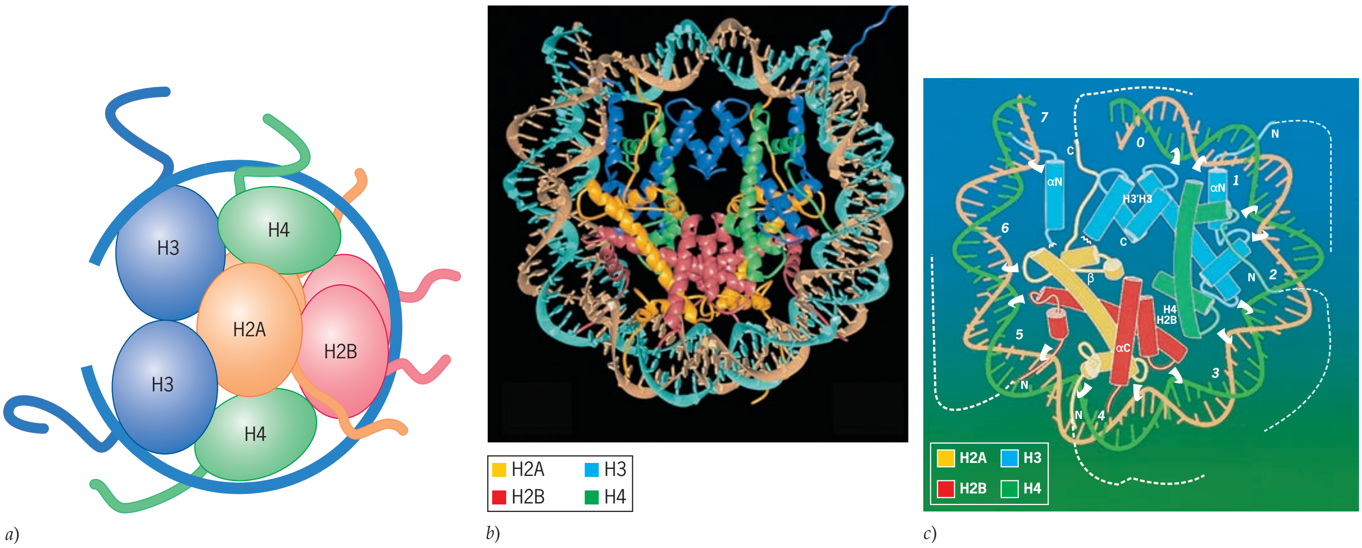



**FIGURA 12-13 Estructura de un nucleosoma.** *a*) Representación esquemática de una partícula nuclear de nucleosoma con su octámero de histonas compuesto por cuatro heterodímeros de histona (dos dímeros H3/H4 y dos dímeros H2A/H2B). *b*) Estructura cristalográfica de rayos X de una partícula nuclear del nucleosoma vista en el eje central de la superhélice de DNA, que muestra la posición de cada una de las ocho moléculas de histona del octámero del núcleo. Las histonas están organizadas en cuatro complejos diméricos. Cada dímero de histona se une a 27 a 28 pares de bases de DNA, con contactos que se producen cuando el surco menor del DNA se enfrenta al núcleo de la histona. c) Modelo simplificado y esquemático de la mitad de una partícula nuclear del nucleosoma, que muestra un giro (73 pares de bases) de la superhélice de DNA y cuatro moléculas de histona nuclear. Las cuatro histonas diferentes se muestran en colores separados, como lo indica la clave. Se considera que cada histona nuclear consta de 1) una región globular, llamada "pliegue de histonas", que consta de tres hélices α (representadas por los cilindros) y 2) una cola N-terminal flexible y extendida (indicada por la letra N) que se proyecta fuera del disco de histonas y pasa la doble hélice de DNA. Los puntos intermitentes de interacción entre las moléculas de histona y el DNA están indicados por ganchos blancos. Las líneas discontinuas indican la parte más externa de las colas de las histonas, que son sitios de modificación. Estas colas flexibles carecen de una estructura terciaria definida y, por tanto, no aparecen en la estructura de rayos X que se muestra en la parte *b*.

FUENTE: *a*) Tomado de C David Allis, *et al*. Epigenética, fig. 3.5, p. 30, copyright 2007. Reimpreso con autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press; *b*) Tomado de Karolin Luger y Timothy J Richmond, *et al*. *Nature* 1997;389:252, fig. 1. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited; c) Tomado del dibujo por D Rhodes; © 1997, por Macmillan Publishers Limited.

soma obtenida mediante cristalografía de rayos X. Las ocho moléculas de histona que comprenden una partícula nuclear del nucleosoma se organizan en cuatro heterodímeros: dos dímeros H2A-H2B y dos dímeros H3-H4 (figura 12-13*a,b*). La dimerización de las moléculas de la histona está mediada por sus dominios C terminal, que consisten principalmente en hélices α (representadas por los cilindros de la figura 12-13*c*) plegadas en una masa compacta en el núcleo del nucleosoma. En contraste, los segmentos N-terminal de cada histona nuclear (y también el segmento C terminal de H2A) toman la forma de una cola larga y flexible (representada por las líneas discontinuas de la figura 12-13*c*) que se extiende a través de la hélice de DNA que está envuelta alrededor de la partícula del núcleo. Durante muchos años, se pensó en las histonas como moléculas estructurales e inertes, pero los segmentos N-terminal que se extienden son objetivos de las enzimas clave que desempeñan un papel en hacer que la cromatina sea accesible para las proteínas. De esta manera, la cromatina es un componente celular dinámico en el que las

histonas, las proteínas reguladoras y una variedad de enzimas se mueven dentro y fuera del complejo de nucleoproteínas para facilitar las complicadas tareas de transcripción, compactación, replicación, recombinación y reparación de DNA.

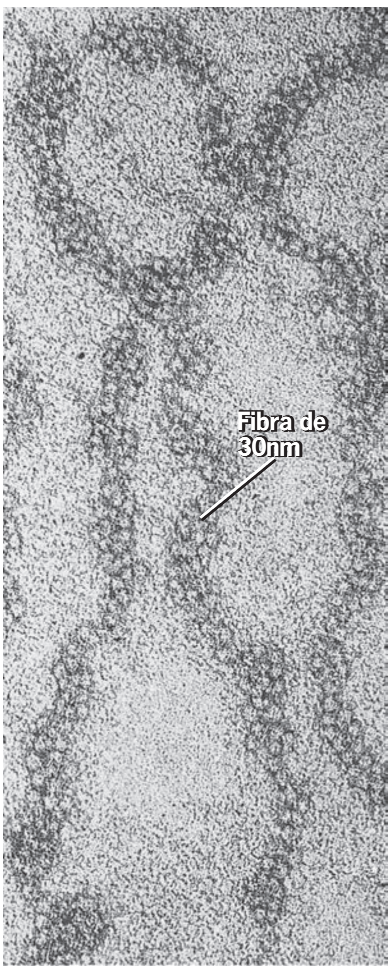
La modificación de histonas no es el único mecanismo que altera el carácter de las histonas de los nucleosomas. Además de las cuatro histonas nucleares "convencionales" discutidas antes, varias versiones alternativas de las histonas H2A y H3 también se sintetizan en la mayoría de las células. La importancia de estas variantes de histonas, como se les llama, no se ha explorado en gran parte todavía, pero se cree que tienen funciones especializadas. La localización y la función aparente de una de estas variantes, CENP-A, se aborda en la página 477. Otra variante, H2A.X, se distribuye a través de la cromatina, donde reemplaza a H2A convencional en una fracción de los nucleosomas. H2A.X se fosforila en sitios de rotura de las cadenas de DNA y puede tener un papel en el reclutamiento de las enzimas que reparan el DNA. Otras dos variantes principales de histona nuclear, H2A.Z y H3.3, se han visto implicadas en numerosas actividades, incluida la activación de la transcripción, pero existe debate acerca de sus roles.

Esta sección comenzó con una pregunta: ¿cómo un núcleo de 10 μm de diámetro puede empacar 200 000 veces esta longitud de DNA dentro de sus límites? El ensamblaje de nucleosomas es el primer paso importante en el proceso de compactación. Con una separación nucleótido–nucleótido de 0.34 nm, los 200 pares de bases de un solo nucleosoma de 10 nm se estirarían a casi 70 nm, si se extendieran por completo. En consecuencia, se dice que la relación de empaquetamiento del DNA de los nucleosomas es aproximadamente de 7:1.

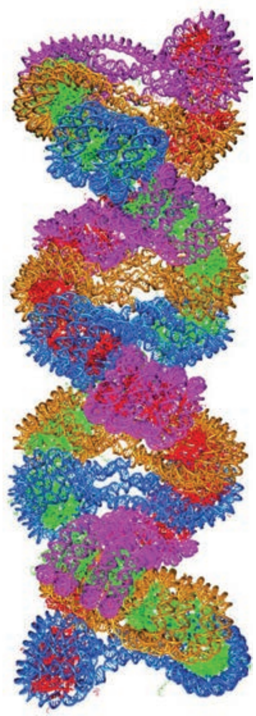
## Niveles más altos de la estructura de la cromatina

Una molécula de DNA envuelta alrededor de partículas nucleares del nucleosoma de 10 nm de diámetro es el nivel más bajo de la organización de la cromatina. Sin embargo, la cromatina no existe dentro de la célula en este estado relativamente extendido, "cuentas-en-un-collar". Cuando la cromatina se libera del núcleo y se prepara con fuerza iónica fisiológica, se observa una fibra de aproximadamente 30 nm de grosor (**FIGURA 12-14*a***). A pesar de más de dos décadas de investigación, la estructura de la fibra de 30 nm sigue siendo objeto de debate. Las reconstrucciones de microscopía crioelectrónica sugieren la estructura que se muestra en la figura 12-14*b,c*, en la cual los nucleosomas se alinean para terminar en dos pilas de nucleosomas que forman una estructura de doble hélice. Los nucleosomas sucesivos a lo largo del DNA se organizan en dos pilas diferentes y los nucleosomas alternados interactúan mediante la hélice a través de su DNA enlazador. El ensamblaje de la fibra de 30 nm aumenta la relación de empaquetamiento de DNA en 6 veces más o unas 40 veces en total.

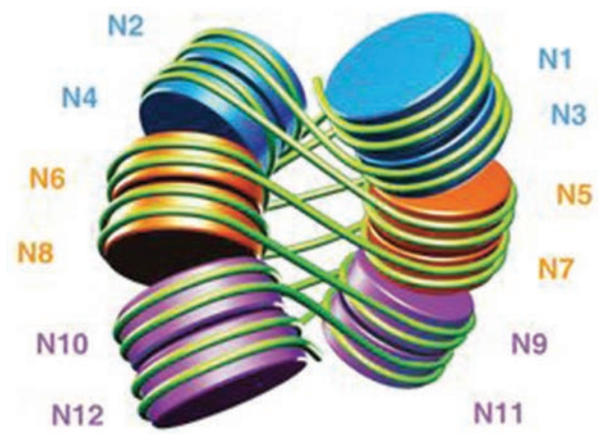
El mantenimiento de la fibra de 30 nm depende de las interacciones entre las moléculas de histona de los nucleosomas vecinos. El enlazador histona y las histonas nucleares han sido implicadas en el empaquetamiento de la cromatina en el orden superior. Si, por ejemplo, las histonas enlazadoras H1 se extraen selectivamente de la cromatina compactada, las fibras de 30 nm se desenrollan para formar el filamento más delgado y alargado que se muestra en la figura 12-12*b*). La adición de histonas H1 conduce a la restauración de la estructura de orden superior. Las




*a*)



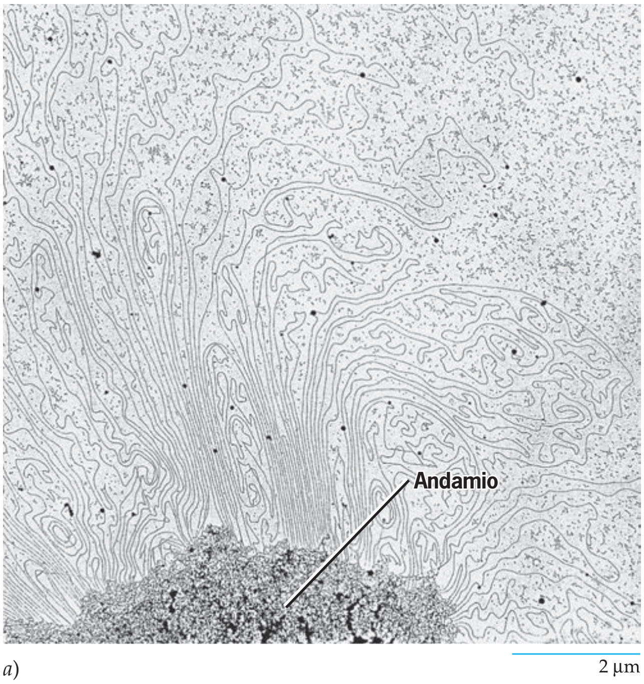
*b*)




*c*)

**FIGURA 12-14 Fibra de 30 nm.** *a*) Micrografía electrónica de una fibra de cromatina de 30 nm liberada de un núcleo después de la lisis de la célula en una solución salina hipotónica. *b*) Modelo para la estructura de la fibra de 30 nm que se basa en el ajuste de estructuras atómicas de nucleosomas en datos de microscopía crioelectrónica. Las histonas se muestran en rojo y verde. El DNA se muestra en azul, dorado y morado. Los nucleosomas se alinean para formar una doble hélice con pares de nucleosomas sucesivos en la cadena (representados aquí por el mismo color de DNA) que alternan entre las dos hélices, con DNA enlazador que se extiende a través de la mitad de la doble hélice. *c*) Esquema de la estructura de la fibra, que muestra 12 nucleosomas numerados N1-N12, que se acumulan en pares. Estos pares se asocian entonces de extremo a extremo para formar las dos cadenas de una doble hélice. El DNA enlazador se muestra en verde.

FUENTE: *a*) Cortesía de Barbara Hamkalo y Jerome B Rattner; *b*, *c*) Tomado de: Feng Song, *et al*. *Science* 2014;344:376-380.



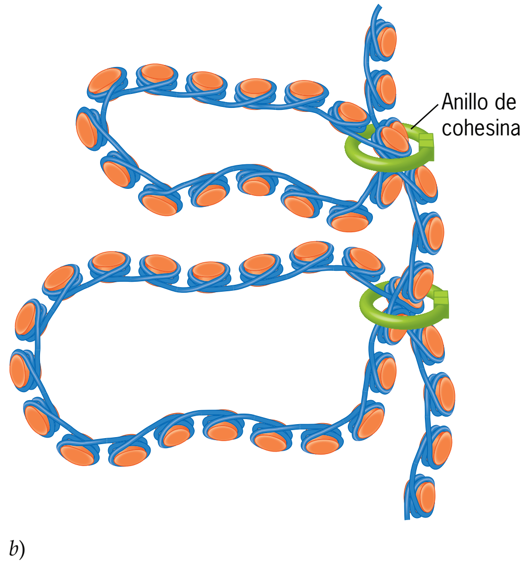




**FIGURA 12-15 Asas de cromatina: un nivel más alto de la estructura de la cromatina.** *a*) Micrografía electrónica de un cromosoma mitótico que se había tratado para eliminar histonas. El cromosoma sin histonas muestra asas de DNA que están unidas en sus bases a un andamio de proteína residual. *b*) Modelo simplificado por el cual los anillos de cohesión podrían desempeñar un papel en el mantenimiento de las asas de DNA de interfase.

FUENTE: *a*) Tomado de: James R Paulson y UK Laemmli. *Cell* 1977;12:823, con permiso de Elsevier.

histonas nucleares de los nucleosomas adyacentes pueden interactuar entre sí por medio de sus colas largas y flexibles. Los estudios estructurales indican, por ejemplo, que la cola N-terminal de una histona H4 de una partícula nuclear del nucleosoma puede alcanzar y hacer un contacto extenso tanto con el DNA enlazador entre partículas del nucleosoma, como con el dímero H2A/H2B de partículas adyacentes. Se cree que estos tipos de interacciones median el plegamiento del filamento nucleosomal en una fibra más gruesa. De hecho, las fibras de cromatina preparadas con histonas H4 que pierden sus colas no pueden plegarse en fibras de orden superior.

Se cree que la próxima etapa en la jerarquía del empaquetamiento de DNA ocurre cuando la fibra de cromatina de 30 nm se reúne en una serie de asas o dominios grandes superenrollados, que pueden compactarse en fibras incluso más gruesas (80-100 nm). Las asas de DNA aparentemente se unen a sus bases para formar proteínas que pueden ser parte de un andamio nuclear poco definido. Normalmente, las asas de fibras de cromatina se extienden dentro del núcleo y no se pueden visualizar, pero su presencia puede revelarse en ciertas circunstancias. Por ejemplo, cuando los cromosomas mitóticos aislados se tratan con soluciones que extraen histonas, se puede ver que el DNA libre de histonas se extiende hacia afuera como asas de un andamio de proteína (**FIGURA 12-15*a***). Entre las proteínas que se cree que desempeñan un papel clave en el mantenimiento de estas asas de DNA se encuentra la cohesina, que se conoce mejor por su función en la retención de moléculas de DNA replicadas juntas durante la mitosis (sección 14.7). La cohesina es una proteína con forma de anillo que puede actuar como se muestra en la **FIGURA 12-15*b*)**.

El cromosoma mitótico representa lo último en cromatina compactada; 1 μm de longitud del cromosoma mitótico por lo común contiene aproximadamente 1 cm de DNA, lo que representa una relación de empaque de 10 000:1. Esta compactación se produce por un proceso poco conocido que se analiza en la sección 14.7. En la **FIGURA 12-16** se muestra una visión general de los

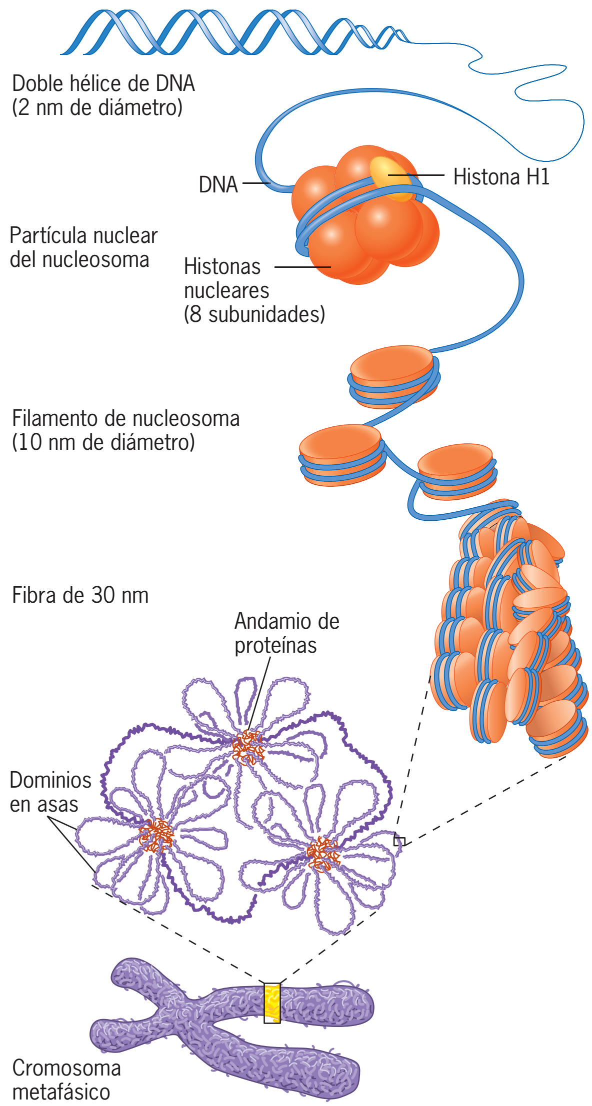



**FIGURA 12-16 Niveles de organización de la cromatina.** Las moléculas de DNA desnudo se envuelven alrededor de las histonas para formar nucleosomas, que representan el nivel más bajo de la organización de la cromatina. Los nucleosomas están organizados en fibras de 30 nm, que a su vez están organizadas en dominios de asas. Cuando las células se preparan para la mitosis, las asas se compactan aún más en los cromosomas mitóticos (véase figura 14-13).

distintos niveles de organización de la cromatina, desde el filamento nucleosomal hasta un cromosoma mitótico.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la relación entre las histonas y el DNA de una partícula nuclear de nucleosoma? ¿Cómo se reveló por primera vez la existencia de nucleosomas? ¿Cómo se organizan los nucleosomas en niveles más altos de cromatina?

## 12.4 Heterocromatina

Una vez que se ha completado la mitosis, la mayor parte de la cromatina en los cromosomas mitóticos altamente compactados vuelve a su condición de interfase difusa. Sin embargo, alrededor de 10% de la cromatina permanece, por lo general, en una forma condensada y compactada en toda la interfase. Esta cromatina compactada y densamente teñida se concentra normalmente cerca de la periferia del núcleo, a menudo cerca de la lámina nuclear, como se indica en la figura 12-5*a*. La cromatina que permanece compactada durante la interfase se llama **heterocromatina,** para distinguirla de la **eucromatina**, que vuelve a un estado activo disperso. Cuando se administra un precursor de RNA marcado radiactivamente, como [$^3$H] uridina a las células que se fijan, seccionan y autorradiografían con posterioridad, las agrupaciones de heterocromatina se mantienen en gran parte sin marcar, lo que indica que tienen una actividad transcripcional relativamente pequeña. Se cree que las regiones periféricas del núcleo contienen factores que promueven la represión transcripcional, lo que las convierte en un entorno favorable para la localización de la heterocromatina. Como se verá más adelante, el estado de una región particular del genoma, ya sea eucromático o heterocromático, se hereda de forma estable de una generación de células a la siguiente.

La heterocromatina se divide en dos clases. La **heterocromatina constitutiva** permanece en estado compactado en todas las células en todo momento y, por tanto, representa DNA que se silencia de forma permanente. En las células de los mamíferos, la mayor parte de la heterocromatina constitutiva se encuentra en las regiones que flanquean los telómeros y el centrómero de cada cromosoma y en algunos otros sitios, como el brazo distal del cromosoma Y en los mamíferos machos. El DNA de la heterocromatina constitutiva consiste sobre todo en secuencias repetidas (p. 384) y contiene relativamente pocos genes. De hecho, cuando los genes que son por lo común activos se mueven en una posición adyacente a estas regiones como resultado de la transposición o translocación, tienden a silenciarse transcripcionalmente, un fenómeno conocido como *efecto de posición*. Se entiende que la heterocromatina contiene componentes cuya influencia puede extenderse hasta cierta distancia, afectando genes cercanos. La propagación de heterocromatina a lo largo del cromosoma está bloqueada, en apariencia, por secuencias de barrera especializadas (*elementos de límite*) en el genoma. La heterocromatina constitutiva también sirve para inhibir la recombinación genética entre secuencias repetitivas homólogas. Este tipo de recombinación puede conducir a duplicaciones y eliminaciones de DNA (véase figura 10-23).

La **heterocromatina facultativa** es la cromatina que se ha inactivado específicamente durante ciertas etapas de la vida de un organismo o en ciertos tipos de células diferenciadas (como en la figura 17-9*b*). Se puede ver un ejemplo de heterocromatina facultativa al comparar los cromosomas sexuales en las células de un mamífero hembra con los de un macho. Las células de los machos tienen un cromosoma Y diminuto y un cromosoma X mucho más grande. Debido a que los cromosomas X y Y tienen sólo unos pocos genes en común, los machos tienen una copia única de la mayoría de los genes que se transportan en los cromosomas sexuales. Aunque las células de las hembras contienen dos cromosomas X, sólo uno de ellos es transcripcionalmente activo. El otro cromosoma X permanece condensado como un grupo heterocromático (**FIGURA 12-17*a***) llamado *cuerpo de Barr*, por el investigador que lo descubrió en 1949. La formación de un cuerpo de Barr garantiza que las células de ambos sexos tengan el mismo número de cromosomas X activos y así sinteticen cantidades equivalentes de los productos codificados por genes vinculados a X.



*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 12-17 Heterocromatina facultativa: el cromosoma X inactivo.** *a*) El cromosoma X inactivado aparece como una estructura heterocromática con tinción oscura, llamada cuerpo de Barr (flechas). *b*) La inactivación aleatoria de cualquiera de los cromosomas X en diferentes células durante el desarrollo embrionario temprano crea un mosaico de parches de tejido y es responsable de los patrones de color en los gatos calicó. Cada parche comprende los descendientes de una célula que estaba presente en el embrión en el momento de la inactivación. Estos parches son visualmente evidentes en los gatos calicó, que son heterocigotos con un alelo para el color del pelaje negro que reside en un cromosoma X y un alelo para el pelaje naranja en el otro X. Esto explica por qué los calicós machos son prácticamente inexistentes, porque todas las células del macho tienen el alelo de color del pelaje negro o anaranjado. (Las manchas blancas en este gato se deben a un gen de color de pelaje autosómico diferente.) C) Este gatito fue clonado del gato que se muestra en *b*. Los dos animales son genéticamente idénticos, pero tienen diferentes patrones de pelaje, un reflejo de la naturaleza aleatoria del proceso de inactivación X (y probablemente otros eventos aleatorios de desarrollo).

FUENTE: *a*) Cortesía de EG (Mike) Bertram; *b*-*c*) Cortesía de la Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencias Biomédicas, Texas A & M University.

## Inactivación del cromosoma X



Sobre la base de sus estudios acerca de la herencia del color del pelaje en ratones, la genetista británica Mary Lyon propuso lo siguiente en 1961:

1. La heterocromatinización del cromosoma X en las hembras de los mamíferos ocurre durante el desarrollo embrionario temprano y conduce a la inactivación de los genes en ese cromosoma.
2. La heterocromatinización en el embrión es un proceso aleatorio en el sentido de que el cromosoma X derivado del padre y el cromosoma X derivado de la madre tienen la misma probabilidad de quedar inactivados *en cualquier célula dada*. En consecuencia, en el momento de la inactivación, el X paterno puede inactivarse en una célula del embrión y el X materno puede inactivarse en una célula vecina. Una vez que el cromosoma X ha sido inactivado, su estado heterocromático se transmite a través de muchas divisiones celulares, de modo que el mismo cromosoma X está inactivo en todos los descendientes de esa célula en particular. El proceso de inactivación del cromosoma X se estudia mejor *in vitro* durante la diferenciación de células madre embrionarias (ES, *embryonic stem*) de ratón. Las células ES se derivan de embriones muy tempranos (p. 18) y, por tanto, tienen dos cromosomas X activos.
3. La reactivación del cromosoma X heterocromatinizado ocurre en células germinales femeninas antes del inicio de la meiosis. Por consiguiente, ambos cromosomas X están activos durante la ovogénesis, y todos los gametos reciben un cromosoma X eucromático.

La hipótesis de Lyon fue confirmada pronto.[2] Debido a que los cromosomas X maternos y paternos pueden contener alelos diferentes para el mismo rasgo, las hembras adultas son, en cierto sentido, mosaicos genéticos, donde los distintos alelos funcionan en diversas células. El mosaicismo del cromosoma X se refleja en la coloración de parches del pelaje de algunos mamíferos, incluidos los gatos calicó (figura 12-17*b,c*). Los genes de pigmentación en los humanos no están localizados en el cromosoma X, de ahí la ausencia de "mujeres calicó". Sin embargo, el mosaicismo debido a la inactivación de X puede demostrarse en mujeres. Por ejemplo, si un haz estrecho de luz roja o verde brilla en los ojos de una mujer que es portadora heterocigota de ceguera para el rojo y el verde, se pueden encontrar parches de células de la retina con una visión defectuosa del color intercalados entre parches con visión normal.

El mecanismo responsable de la inactivación de X ha sido un foco de atención desde un informe de 1992, en el que se sugirió que la inactivación es iniciada por una molécula de RNA no codificante, en lugar de por una proteína, que se transcribe desde uno de los genes (llamado XIST en humanos) en el cromosoma X que se desactiva (el $X_i$). El RNA *XIST* es una transcripción grande (más de 17 kb de longitud), lo cual lo distingue de muchos otros RNA no codificantes que tienden a ser bastante pequeños. Debido a su tamaño, *XIST* se describe como un RNA largo no codificante (o lncRNA) y representa sólo el primero en una lista larga y creciente de lncRNA que se han descubierto como factores reguladores en las actividades celulares. De hecho, ahora se cree que al menos siete lncRNA distintos participan en la inactivación del cromosoma X; el presente debate se ceñirá a *XIST*. El RNA *XIST* se acumula selectivamente a lo largo del cromosoma X, desde el cual se transcribe, donde ayuda a reclutar ciertos complejos proteicos que inactivan los genes en sitios seleccionados.[3] El gen *XIST* es necesario para iniciar la inactivación, pero no para mantenerla de una generación celular a la siguiente. Esta conclusión se basa en el descubrimiento de células tumorales en ciertas mujeres que contienen un cromosoma X inactivado cuyo gen *XIST* se elimina. Se piensa que la inactivación de X se mantiene mediante la metilación de DNA (p. 500) y las modificaciones de histonas represivas, como se analiza en la próxima sección.

## El código de histona y la formación de heterocromatina

La figura 12-13*c* muestra un modelo esquemático de la partícula nuclear del nucleosoma con sus colas de histonas que se proyectan hacia afuera. Pero esta es sólo una descripción general que oculta diferencias importantes entre los nucleosomas. Las células contienen una notable variedad de enzimas que pueden agregar grupos químicos a, o eliminarlos de, residuos de aminoácidos específicos en las colas de histonas. Aquellos residuos que están sujetos a modificación, especialmente por metilación, acetilación, fosforilación o ubiquitinación, están indicados por barras de colores en la **FIGURA 12-18**. La última década ha visto surgir una hipótesis conocida como el **código de histonas**, que postula que el estado y la actividad de una región particular de la cromatina dependen de las modificaciones específicas, o combinación de modificaciones, de las colas de las histonas en esa región. En otras palabras, el patrón de modificaciones que adornan las colas de las histonas nucleares contiene información codificada que gobierna las propiedades de esos nucleosomas. Los estudios sugieren que las modificaciones de la cola de las histonas actúan de dos maneras para influir en la estructura y la función de la cromatina.

1. Los residuos modificados sirven como sitios de ataque para reclutar una colección específica de proteínas no histónicas, que luego determina las propiedades y actividades de ese segmento de la cromatina. En la **FIGURA 12-19** se representa una muestra de algunas de las proteínas específicas que se unen selectivamente a restos de histona modificados. Cada una de las proteínas unidas a las histonas en la figura 12-19 es capaz de modular algún aspecto de la actividad o estructura de la cromatina.
2. Los residuos modificados alteran la manera en que las colas de histonas de los nucleosomas vecinos interactúan entre sí o con el DNA al que están unidos los nucleosomas. Los cambios en estos tipos de interacciones pueden conducir a transformaciones en la estructura de orden superior de la cromatina. La acetilación del residuo de lisina en la posición 16 en la histona H4, por ejemplo, interfiere con su interacción con una molécula de histona H2A de un nucleosoma adyacente, que a su vez inhibe la formación de la fibra de cromatina de 30 nm compacta.

Por el momento, la discusión se restringirá a la formación de heterocromatina tal como ocurre, por ejemplo, durante la inactivación del cromosoma X. En aras de la simplicidad, el análisis se centrará en la modificación de un único residuo, la lisina 9 de H3, que ilustrará los principios generales por los cuales las células utilizan el código de histonas. Las acciones de varias otras modificaciones de histonas se indican en la figura 12-18 y se examinan en la leyenda que la acompaña. En la página 496 se describe otro ejemplo. Como se verá a lo largo de este capítulo, en

[2] La inactivación aleatoria de los cromosomas X discutida aquí, que ocurre después de los implantes embrionarios en el útero, es en realidad la segunda ola de inactivación del cromosoma X que se produce en el embrión. La primera ola, que sucede muy temprano en el desarrollo, no es aleatoria, sino que sólo conduce a la inactivación de los cromosomas X que han sido donados por el padre. Esta inactivación temprana de los cromosomas X paternos se mantiene en las células que dan lugar a los tejidos extraembrionarios (p. ej., la placenta) y no se discute en el texto. La inactivación precoz del X paterno se borra en las células que producen tejido embrionario y posteriormente ocurre la inactivación aleatoria de X.

[3] Aproximadamente 15% de los genes en el cromosoma escapan de la inactivación por un mecanismo desconocido. Los "escapados" incluyen genes que también están presentes en el cromosoma Y, lo que garantiza que se expresen por igual en ambos sexos.

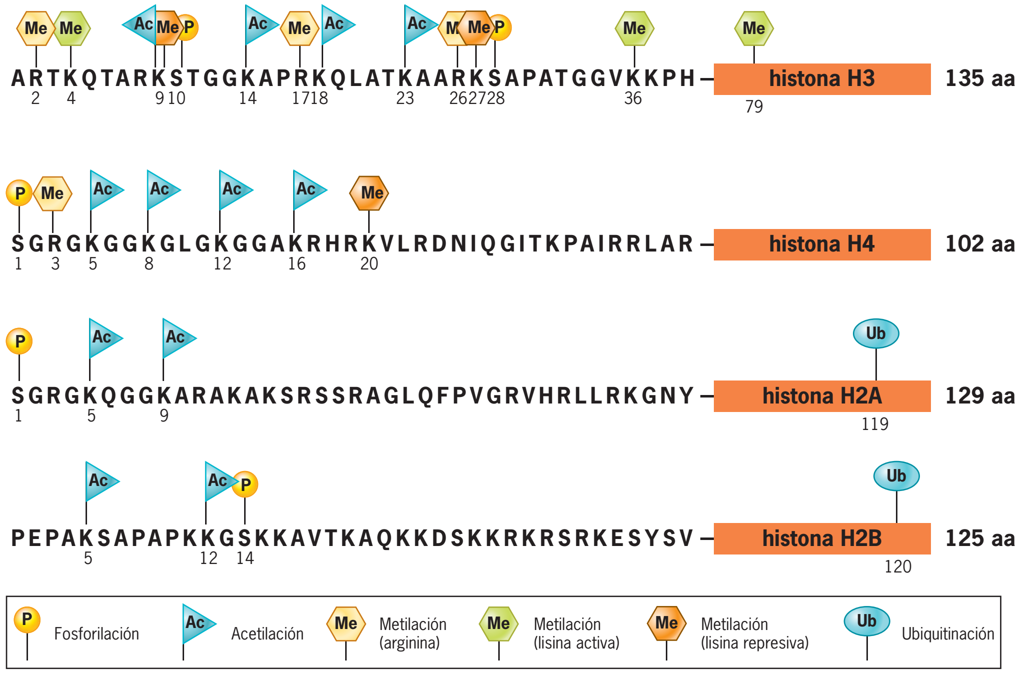



**FIGURA 12-18 Modificaciones de histona y el código de histonas.** Las colas amino terminales de las proteínas histonas que se extienden más allá del DNA en los nucleosomas pueden modificarse enzimáticamente mediante la adición covalente de grupos metilo, acetilo y fosfato. Se añaden grupos metilo a residuos de lisina (K) o arginina (R), grupos acetilo a residuos de lisina y grupos fosfato a residuos de serina (S). La pequeña proteína ubiquitina se puede agregar a uno de los residuos de lisina en el núcleo (en lugar de la cola) de H2A y H2B. Cada residuo de lisina puede tener uno, dos o tres grupos metilo añadidos, y cada residuo de arginina puede tener uno o dos grupos metilo añadidos. Estas modificaciones afectan la afinidad de la histona por las proteínas que interactúan y controlan la actividad transcripcional de la cromatina, lo que ha llevado al concepto de código de histonas. Es muy conocido que la acetilación de lisinas conduce a la activación transcripcional. Los efectos de la metilación dependen con fuerza de cuál de estos residuos se modifica. Por ejemplo, la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (es decir, H3K9) suele estar presente en la heterocromatina y está asociada con la represión transcripcional, como se explica en el texto. La metilación de H3K27 y H4K20 también está intensamente relacionada con la represión transcripcional, mientras que la metilación de H3K4 y H3K36 se asocia con la activación transcripcional. Del mismo modo que existen enzimas que catalizan cada una de estas modificaciones, también existen enzimas (desacetilasas, desmetilasas, fosfatasas y desubiquitinasas) que las eliminan específicamente.

FUENTE: Tomado de C David Allis, *et al. Epigenetics*, fig. 3.6, p. 31, Copyright 2007. Reproducido con permiso del Cold Spring Harbor Press.

los últimos años se han desarrollado técnicas para analizar cambios que afectan la transcripción del genoma, como las modificaciones de histonas, en el ámbito de todo el genoma, en lugar de simplemente observar estos cambios en un gen a la vez. Esto ha brindado una visión mucho más amplia de la importancia general de cada uno de estos fenómenos, de lo que fue posible hace sólo unos pocos años.

La comparación de los nucleosomas presentes dentro de los dominios de cromatina heterocromática *versus* eucromática reveló una diferencia llamativa. El residuo de lisina en la posición núm. 9 (Lys9 o K9) de la histona H3 en dominios heterocromáticos está en gran parte metilado, mientras que este mismo residuo en los dominios eucromáticos suele estar acetilado. La eliminación de los grupos acetilo de las histonas H3 y H4 es uno de los pasos iniciales en la conversión de eucromatina en heterocromatina. La correlación entre la represión transcripcional y la desacetilación de histonas se puede observar comparando el cromosoma X heterocromático inactivo de las células femeninas, que contiene histonas desacetiladas, con el cromosoma X eucromático activo, cuyas histonas presentan un nivel de acetilación anormal (**FIGURA 12-20**). La desacetilación de histona se acompaña de la metilación de H3K9, que es catalizada por una enzima (una *histona*

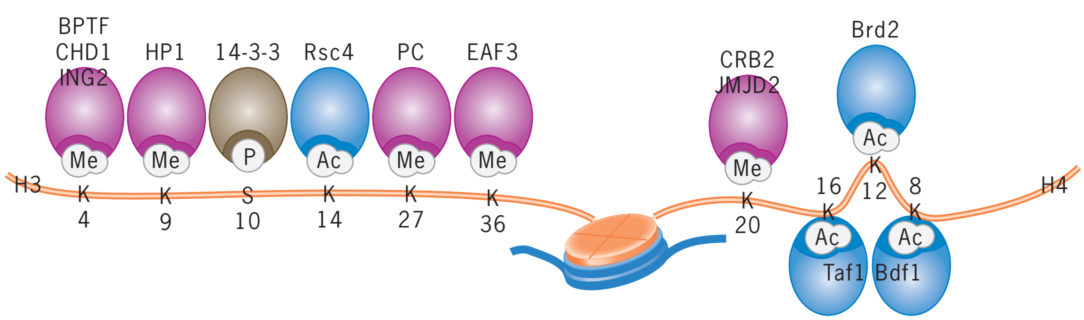



**FIGURA 12-19 Ejemplos de proteínas que se unen selectivamente a residuos H3 o H4 modificados.** Cada una de las proteínas unidas posee una actividad que altera la estructura y/o función de la cromatina. Existe una complejidad adicional que no se muestra en este dibujo, en el sentido de que las modificaciones en un residuo de histona pueden influir en los eventos en otros residuos, un fenómeno conocido como diafonía. Por ejemplo, la unión de la proteína heterocromatina HP1 a H3K9 se bloquea mediante la fosforilación del residuo de serina adyacente (H3S10), que por lo general se produce durante la mitosis.

FUENTE: Tomado de T Kouzarides. *Cell* 2007;128:696; Cell by Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.



**FIGURA 12-20 Demostración experimental de una correlación entre la actividad transcripcional y la acetilación de histonas.** Esta propagación del cromosoma metafásico se ha marcado con anticuerpos fluorescentes para la histona H4 acetilada, que emiten fluorescencia en verde. Todos los cromosomas, excepto el X inactivado, se tiñen de manera brillante con el anticuerpo contra la histona acetilada.

FUENTE: Tomado de P Jeppesen y BM Turner, portada de *Cell* 1993;2(74), con permiso de Elsevier. Cortesía de Peter Jeppesen.

*metiltransferasa*) que parece estar dedicada a esta y sólo esta función particular. Esta enzima, llamada SUV39H1 en los humanos, se puede encontrar localizada dentro de la heterocromatina, donde puede estabilizar la naturaleza heterocromática de la región a través de su actividad de metilación.

La formación de una lisina metilada en la posición núm. 9 transmite a la cola de la histona H3 una importante propiedad: se vuelve capaz de unirse con alta afinidad a las proteínas que contienen un dominio particular, denominado *cromodominio*. El genoma humano contiene, al menos, 30 proteínas con cromodominios, de las cuales, la mejor estudiada es la *proteína heterocromática 1* (o *HP1*). La HP1 ha sido implicada en la formación y mantenimiento de la heterocromatina. Una vez unida a una cola de H3, se cree que HP1 interactúa con otras proteínas, incluyendo 1) SUV39H1, la enzima responsable de metilar el residuo de H3K9 y 2) otras moléculas de HP1 en los nucleosomas cercanos. Estas propiedades de unión de la proteína HP1 promueven la formación de una red interconectada de nucleosomas metilados, lo que conduce a un dominio de cromatina de orden superior compacto (véase **FIGURA 12-21**). Lo que es más importante, este estado se transmite a través de las divisiones celulares de una generación de células a la siguiente (se trata en la página 480). Las modificaciones de histona presentes en la célula original deben, de algún modo, instruir la formación de las mismas modificaciones en los nucleosomas recién depositados en las células hijas. Se conoce poco el mecanismo por el cual esto ocurre.

Los estudios en varios organismos indican que los RNA pequeños, de naturaleza similar a aquellos involucrados en la interferencia de RNA (p. 431), desempeñan un papel importante al

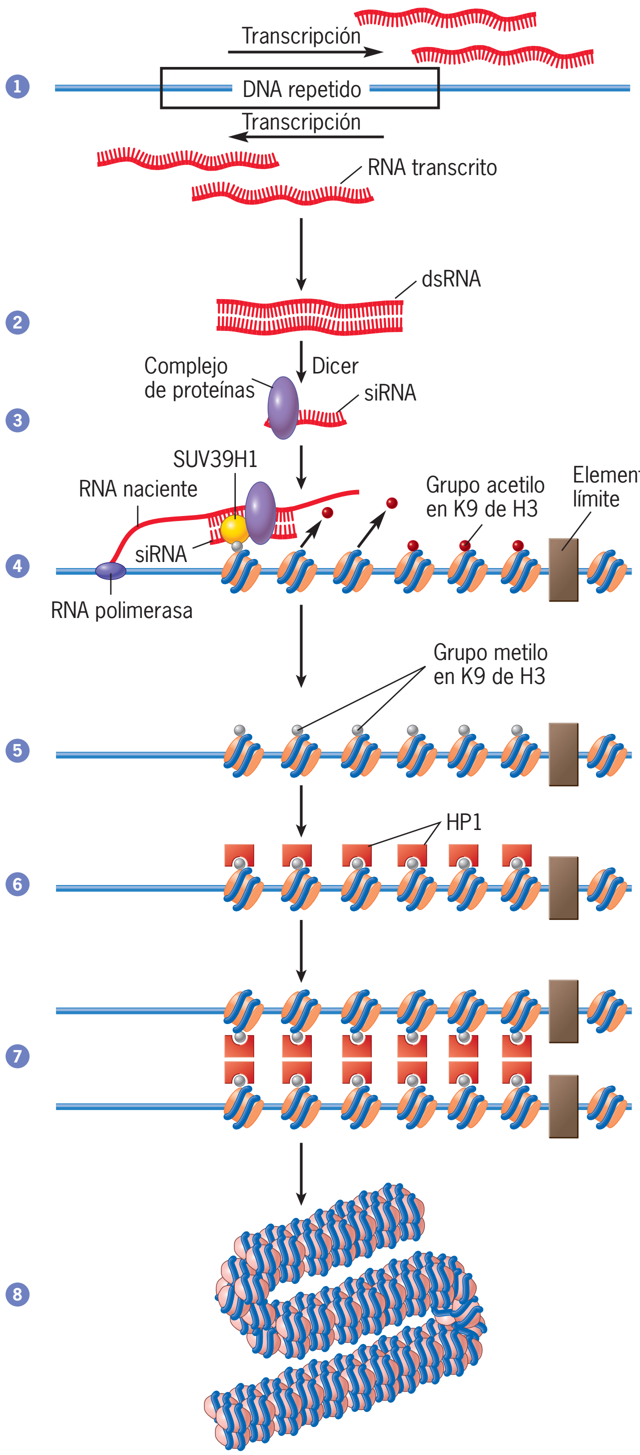



**FIGURA 12-21 Modelo en el que los RNA pequeños rigen la formación de heterocromatina.** Estudios recientes sugieren que los RNA no codificantes desempeñan un papel en la formación de heterocromatina. En este modelo, los RNA se transcriben a partir de ambas cadenas de secuencias de DNA repetitivas (paso 1). Los RNA forman moléculas de doble cadena (paso 2) que son procesadas por la endonucleasa Dicer y otros componentes de la maquinaria de RNAi (p. 431), para formar una guía de siRNA de una sola cadena y un complejo de proteína asociado (paso 3). En el paso 4, el complejo siRNA-proteína se ha unido a un segmento complementario de un RNA naciente y ha reclutado la histona metiltransferasa SUV39H1. Esto conduce a la adición de grupos metilo al residuo K9 de la histona H3, reemplazando a los grupos acetilo que se unieron previamente a los residuos H3K9. (Los grupos acetilo, que son característicos de regiones transcritas de eucromatina, se eliminan enzimáticamente de los residuos de lisina mediante una histona desacetilasa, que no se muestra.) En el paso 5, los grupos acetilo han sido reemplazados por grupos metilo, que sirven como sitios de enlaces para la proteína HP1 (paso 6). El elemento límite en el DNA evita la propagación de la heterocromatinización en regiones adyacentes de la cromatina. Una vez que HP1 se ha unido a las colas de histonas, la cromatina se puede empaquetar en estructuras de mayor orden y más compactas por medio de la interacción entre las moléculas de proteína HP1 (paso 7). La enzima SUV39H1 también se puede unir a las colas de histonas metiladas (no se muestra) para que los nucleosomas adicionales puedan metilarse. En el paso 8, se ha formado una región de heterocromatina altamente compactada.

dirigirse a una región particular del genoma para someterse a metilación de H3K9 y posterior heterocromatinización. En la figura 12-21 se presenta un modelo que muestra los tipos de eventos que se cree que tienen lugar durante el ensamblaje de heterocromatina. Los RNA derivados de elementos altamente repetitivos, como los centrómeros, o de regiones que albergan elementos transponibles se procesan mediante la vía de interferencia de RNA y funcionan para reclutar enzimas de modificación de histonas, incluidas las histonas metiltransferasas que modifican la lisina 9 en la histona H3. La modificación de esta manera recluta miembros de la familia de proteínas del cromodominio HP1, lo que conduce a la formación de heterocromatina y al silenciamiento génico. Esto es particularmente importante para el silenciamiento de elementos móviles transponibles y posiblemente del DNA viral. Si se eliminan los componentes de la maquinaria de RNAi, se deteriora la metilación de H3K9 y la heterocromatinización, lo que permite la activación de elementos de DNA móviles. Además de su papel en la formación de heterocromatina, la maquinaria de RNAi también puede funcionar en el mantenimiento del estado heterocromático de una generación de células a la siguiente. Estos hallazgos apuntan a otro rol más, dentro de una lista de roles en rápido crecimiento, realizada por RNA no codificantes. No sería sorprendente, dado que ahora se piensa que la mayor parte del genoma se transcribe (p. 436), descubrir que los RNA tienen un papel importante en la orientación de muchos de los cambios en la estructura de la cromatina, que se sabe que ocurren durante el desarrollo embrionario o en respuesta a estímulos fisiológicos.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la diferencia en la estructura y función entre heterocromatina y eucromatina? ¿Entre heterocromatina constitutiva y facultativa? ¿Entre un cromosoma X activo y uno inactivo en una célula de mamífero hembra? ¿Cómo es el código de histonas un determinante del estado de una región de cromatina?

## 12.5 Estructura de un cromosoma mitótico

El estado relativamente disperso de la cromatina de una célula en interfase favorece las actividades de interfase, como la replicación y la transcripción. En contraste, la cromatina de una célula mitótica existe en su estado más altamente condensado, lo que facilita el suministro de DNA a cada célula hija. Cuando un cromosoma sufre compactación durante la profase mitótica, adopta una forma distinta y predecible, determinada principalmente por la longitud de la molécula de DNA en ese cromosoma y la posición del centrómero (que se analiza más adelante). Los cromosomas mitóticos de una célula en división pueden mostrarse mediante la técnica representada en la **FIGURA 12-22*a***). En esta técnica, una célula en división se abre y los cromosomas mitóticos del núcleo de la célula se asientan y se unen a la superficie del portaobjetos sobre un área muy pequeña (como en la figura 12-22*b*). Los cromosomas que se muestran en la figura 12-22*b*) se han preparado utilizando una metodología de tinción en la que las preparaciones cromosómicas se incuban con sondas fluorescentes multicolores de DNA que se unen específicamente a cromosomas particulares. Mediante el uso de diversas combinaciones de sondas de DNA y técnicas de visualización asistida por computadora, cada cromosoma puede ser "pintado" con un "color virtual" diferente, lo que lo hace fácilmente identificable para el ojo entrenado. Además de proporcionar una imagen colorida, esta técnica ofrece una resolución excelente, que permite a los genetistas clínicos descubrir aberraciones cromosómicas que de otro modo podrían pasarse por alto (véase figura 2 de "Perspectiva humana" en la sección 12.6).





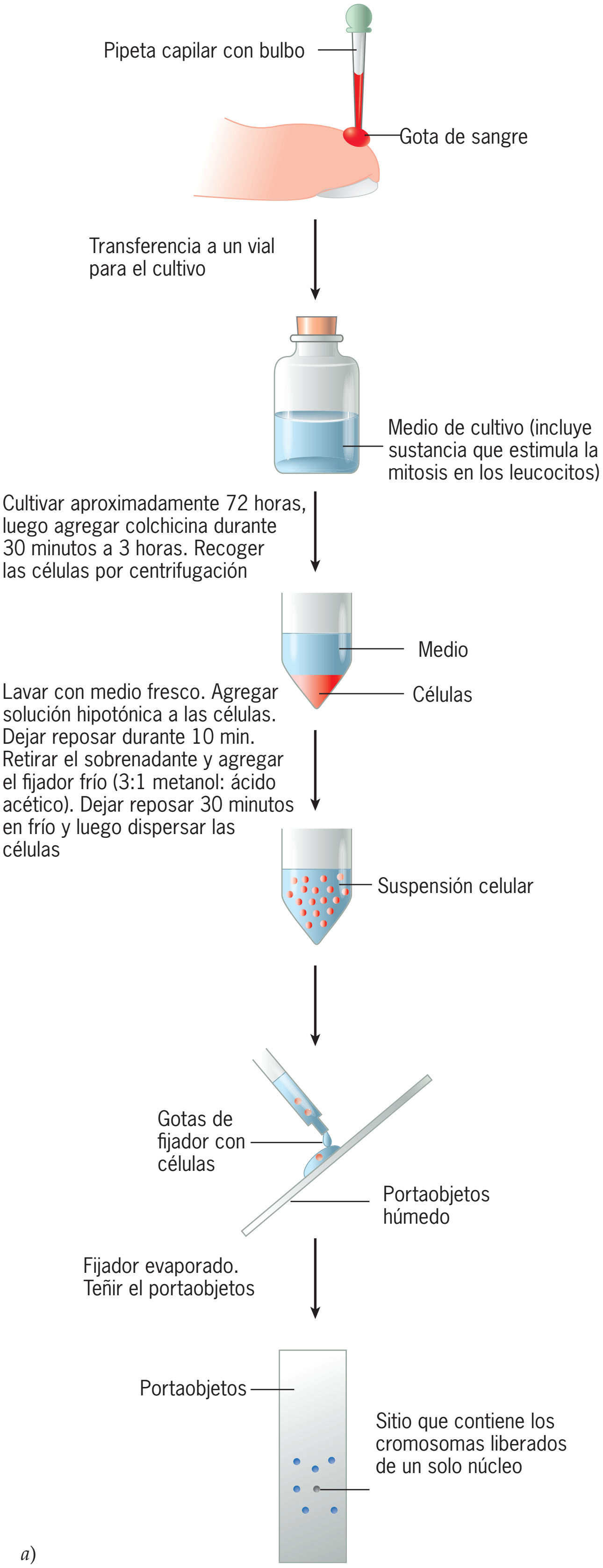
Si los cromosomas individuales se recortan de una fotografía como la de la figura 12-22*b*), pueden emparejarse en pares homólogos (23 en humanos) y ordenarse según el tamaño decreciente, como se muestra en la figura 12-22*c*). Una preparación de este tipo se llama **cariotipo**. Los cromosomas que se muestran en el cariotipo de la figura 12-22*c*) han sido preparados usando un procedimiento de tinción que da a los cromosomas apariencia de bandas cruzadas. El patrón de estas bandas es altamente característico para cada cromosoma de una especie y proporciona una base para identificar cromosomas y compararlos entre una especie y la próxima (véase figura 3 en "Perspectiva humana"). Los cariotipos se preparan de manera rutinaria a partir de cultivos de células sanguíneas y se usan para detectar anormalidades cromosómicas en las personas. Como se discute en "Perspectiva humana", los cromosomas extra, faltantes o extremadamente alterados se pueden detectar de esta forma.

### Telómeros

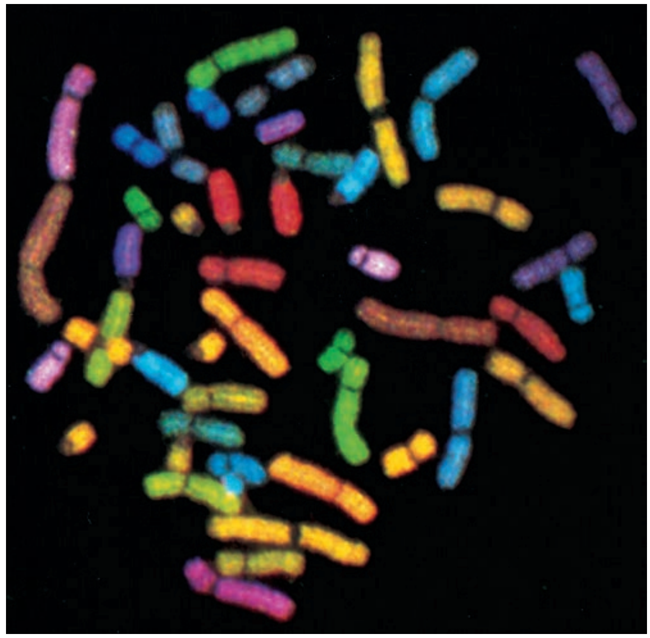
A diferencia de la mayoría de los cromosomas procariotas que consisten en una molécula circular de DNA, cada cromosoma eucariota contiene una sola molécula de DNA continua. Las puntas de cada molécula de DNA están compuestas por un tramo inusual de secuencias repetidas que, junto con un grupo de proteínas especializadas, forman un casquete en cada extremo del cromosoma llamado **telómero**. Los telómeros humanos contienen la secuencia $\frac{\text{TTAGGG}}{\text{AATCCC}}$ repetida alrededor de 500 a 5 000 veces (**FIGURA 12-23*a***). En contraste con la mayoría de las secuencias repetidas, que varían considerablemente de una especie a otra, en todos los vertebrados se encuentra la misma secuencia de telómeros, y secuencias similares se hallan en la mayoría de los otros organismos. Esta similitud en la secuencia sugiere que los telómeros tienen una función conservada en diversos organismos.

Como se discute en el capítulo 13, las DNA polimerasas que replican el DNA no pueden iniciar la síntesis de una hebra de DNA, sino que sólo pueden agregar nucleótidos al extremo 3′ de una hebra existente. La replicación se inicia en el extremo 5′ de cada hebra recién sintetizada mediante la síntesis de un cebador de RNA corto (paso 1, **FIGURA 12-24*a***) que se elimina posteriormente (paso 2). Debido a este mecanismo, y a los pasos de procesamiento adicionales que se muestran en el paso 3, al extremo 5′ de cada hebra le falta un segmento corto de DNA. Como resultado, la hebra con el extremo 3′ cuelga de la hebra con el extremo 5′. En lugar de existir como un terminal de una sola hebra sin protección, la hebra que sobresale se "mete hacia atrás" en la porción de doble hebra del telómero para formar un asa, como se ilustra en la figura 12-24*b*). Existe la opinión de que esta conformación protege el extremo telomérico del DNA. Se han identificado varias proteínas de unión a DNA que se enlazan específicamente a los telómeros y son esenciales para la función de estos. La proteína que se une a los cromosomas en la figura 12-23*b*) desempeña un papel en la regulación de la longitud de los telómeros en la levadura. El DNA telomérico de las células animales se une a un complejo proteico de 6 subunidades llamado shelterina. Entre sus funciones, la shelterina evita que la maquinaria de reparación de DNA de una célula confunda los extremos del DNA telomérico con cadenas de DNA dañadas o rotas, lo que tendría serias consecuencias para la integridad del genoma.

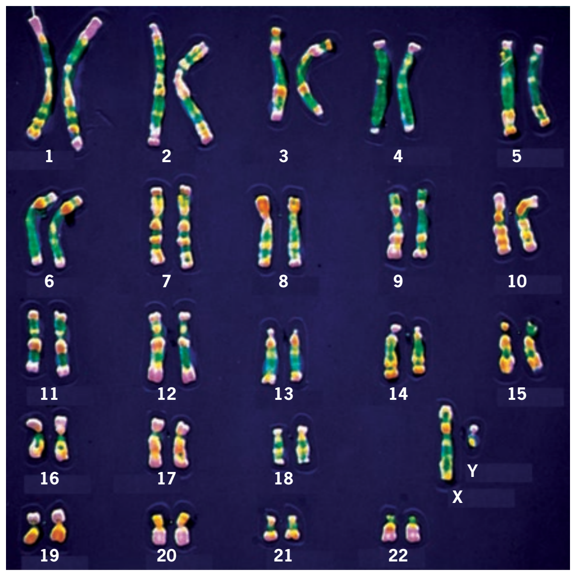
Si las células no fueran capaces de replicar los extremos de su DNA, los cromosomas serían cada vez más cortos con cada ronda de división celular (figura 12-24*a*). Esta situación ha sido llamada el "problema de la replicación final". El mecanismo principal por el cual los organismos resuelven el problema de la replicación final salió a la luz en 1984, cuando Elizabeth Blackburn y Carol Greider, de la Universidad de California, Berkeley, descubrieron




*a*)



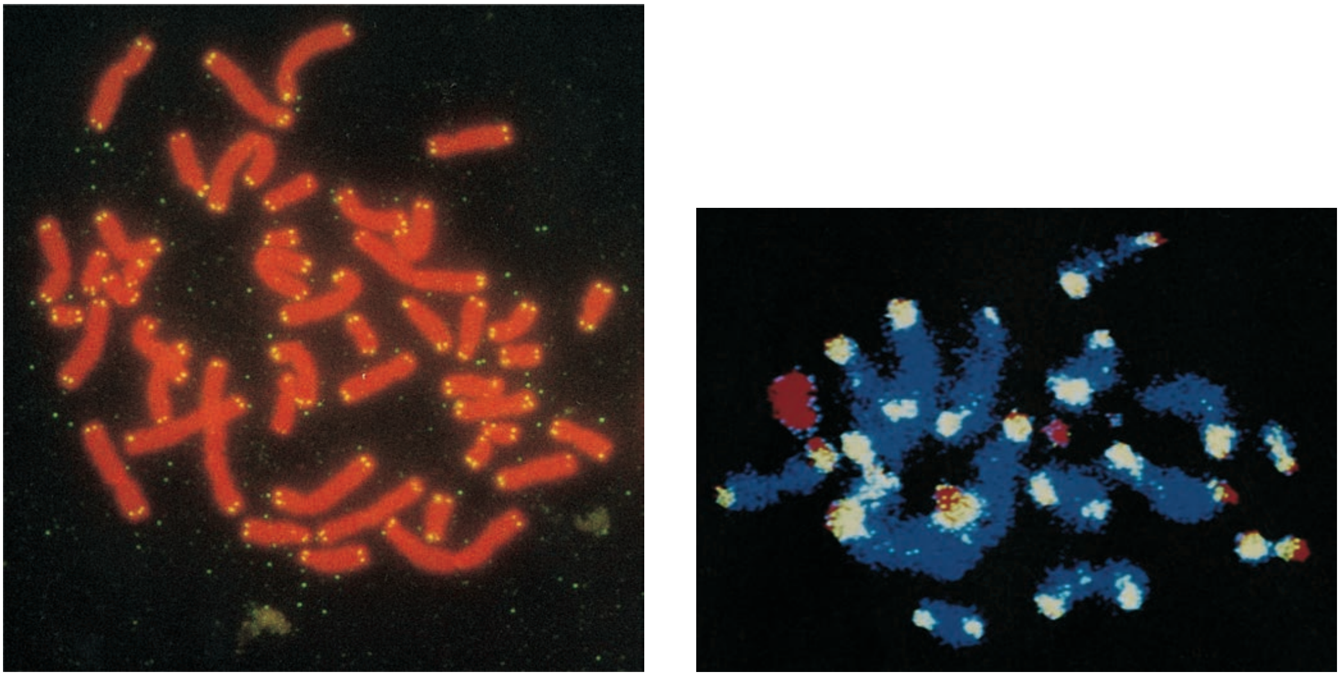
*b*)




*c*)

**FIGURA 12-22 Cromosomas y cariotipos mitóticos humanos.** *a*) Procedimiento utilizado para obtener preparaciones de cromosomas mitóticos para la observación microscópica de leucocitos en la sangre periférica. *b*) Fotografía de un grupo de cromosomas mitóticos de una sola célula humana en división. El DNA de cada cromosoma se hibridó con una clasificación de sondas de DNA que están unidas covalentemente a dos o más tintes fluorescentes. Diferentes cromosomas unen diferentes combinaciones de estos tintes y, en consecuencia, emiten luz de diferentes longitudes de onda. Los espectros de emisión de diferentes cromosomas se convierten en colores de visualización distintos y reconocibles mediante el procesamiento computarizado. Los pares de cromosomas homólogos se pueden identificar buscando cromosomas del mismo color y tamaño. *c*) Cromosomas teñidos de un hombre dispuestos en un cariotipo. Los cariotipos que muestran pares de homólogos, ordenados según el tamaño del cromosoma, se preparan a partir de una fotografía de cromosomas liberados desde un solo núcleo.

FUENTE: *b*) Tomado de E. Schrock, *et al*. *Science* 1996;273:495; © 1996, cortesía de Evelin Schrock y Thomas Ried. Reproducido con permiso de AAAS; *c*) CNRI/Science Photo Library/Photo Researchers.



*a*) *b*) 2 µm

**FIGURA 12-23 Telómeros.** *a*) Hibridación *in situ* de una sonda de DNA que contiene la secuencia TTAGGG, que se localiza en los telómeros de los cromosomas humanos. *b*) Demostración de que ciertas proteínas se unen específicamente al DNA telomérico. Estos cromosomas se prepararon a partir de un núcleo meiótico de una célula de levadura y se incubaron con la proteína RAP1, que posteriormente se localizó en los telómeros mediante un anticuerpo fluorescente antiRAP1. Las áreas azules indican la tinción de DNA, las áreas amarillas representan el marcaje del anticuerpo antiRAP1, y el rojo muestra el RNA teñido con yoduro de propidio. Los humanos tienen una proteína telomérica homóloga (hRAP1, que es parte del complejo de shelterina).

FUENTE: *a*) Tomado de J Meyne, in RP Wagne. *Chromosomes: A Synthesis*. Wiley; 1993, © 1993. Este material se usa con el permiso de John Wiley & Sons, Inc.; *b*) Tomado de Franz Klein, *et al*. *J Cell Biol* 1992;117:940, fig. 4c. Cortesía de Susan M Gasser, reproducida con permiso de la Rockefeller University Press.

una nueva enzima, llamada **telomerasa**, que puede agregar nuevas unidades de repetición al extremo 3′ de la cadena sobresaliente (figura 12-24*c*). Una vez que se ha alargado el extremo 3′ de la cadena, una DNA polimerasa convencional puede usar el segmento 3′ recién sintetizado como una plantilla para devolver el extremo 5′ de la cadena complementaria a su longitud previa. La telomerasa es una transcriptasa inversa que sintetiza DNA utilizando una plantilla de RNA. A diferencia de la mayoría de las transcriptasas inversas, la enzima en sí misma contiene el RNA que sirve como su plantilla (figura 12-24*c*).

Los telómeros son partes muy importantes de un cromosoma: son necesarios para la replicación completa del cromosoma, forman casquetes que protegen los cromosomas de las nucleasas y otras influencias desestabilizadoras, y evitan que los extremos de los cromosomas se fusionen entre sí. La **FIGURA 12-25** muestra cromosomas mitóticos de un ratón que ha sido diseñado genéticamente para carecer de telomerasa. Muchos de los cromosomas se han sometido a fusión de extremo a extremo, lo que conduce a consecuencias catastróficas, ya que los cromosomas se desgarran en divisiones celulares posteriores. Experimentos recientes sugieren roles adicionales para los telómeros, por lo que se han convertido en un centro de investigación actual.

Supongamos que un investigador realiza una pequeña biopsia de su piel, aísla una población de fibroblastos de la dermis y permite que estas células crezcan en un medio de cultivo enriquecido. Los fibroblastos se dividirían más o menos cada día en el cultivo y, finalmente, cubrirían el plato. Si se eliminara una fracción de estas células del primer plato y se volviera a colocar en un segundo plato, proliferarían una vez más hasta cubrir también el segundo plato. Se podría pensar que estas células pueden subcultivarse indefinidamente, como se creyó en la primera mitad del siglo pasado, pero sería una equivocación. Como descubrieron en 1961 Leonard Hayflick y Paul Moorhead del Instituto Wistar en Filadelfia, las células dejan de dividirse por completo después de, aproximadamente, 50 a 80 duplicaciones de población, y entran en una etapa conocida como *senescencia replicativa*. Si se compara la longitud promedio de los telómeros en los fibroblastos al comienzo y al final del experimento, se encuentra una disminución radical en dicha longitud en el transcurso del tiempo en cultivo. Los telómeros se contraen, porque la mayoría de las células carecen de telomerasa y no pueden evitar la pérdida de sus extremos cromosómicos. Con cada división celular, los telómeros de los cromosomas se vuelven cada vez más cortos. El acortamiento de los telómeros continúa hasta un punto crítico, en el que se desencadena una respuesta fisiológica dentro de cada célula, que hace que esa célula deje de crecer y dividirse. Las células capaces de reactivar la telomerasa pueden reanudar el crecimiento y la división y convertirse en inmortales. Tales células, por lo general, también pueden causar cáncer (véase página 710).

Curiosamente, la telomerasa está ausente de la mayoría de las células del cuerpo, pero hay excepciones importantes. Las células germinales de las gónadas conservan la actividad de la telomerasa, y los telómeros de sus cromosomas no se contraen como resultado de la división celular. En consecuencia, cada descendiente comienza su vida como un cigoto que contiene telómeros de longitud máxima. Del mismo modo, las células madre ubicadas en el revestimiento de la piel y el intestino, y las células madre hematopoyéticas de los tejidos que forman la sangre también expresan esta enzima, lo que permite que estas células sigan proliferando y generando la gran cantidad de células diferenciadas requeridas en estos órganos. La importancia de la telomerasa se revela por una rara afección, en la que los individuos tienen niveles de telomerasa muy reducidos, ya que son heterocigotos para el gen que codifica cualquiera de los RNA de la telomerasa o una de las subunidades de proteínas. Estos individuos sufren de insuficiencia de la médula ósea, debido a la incapacidad de este tejido

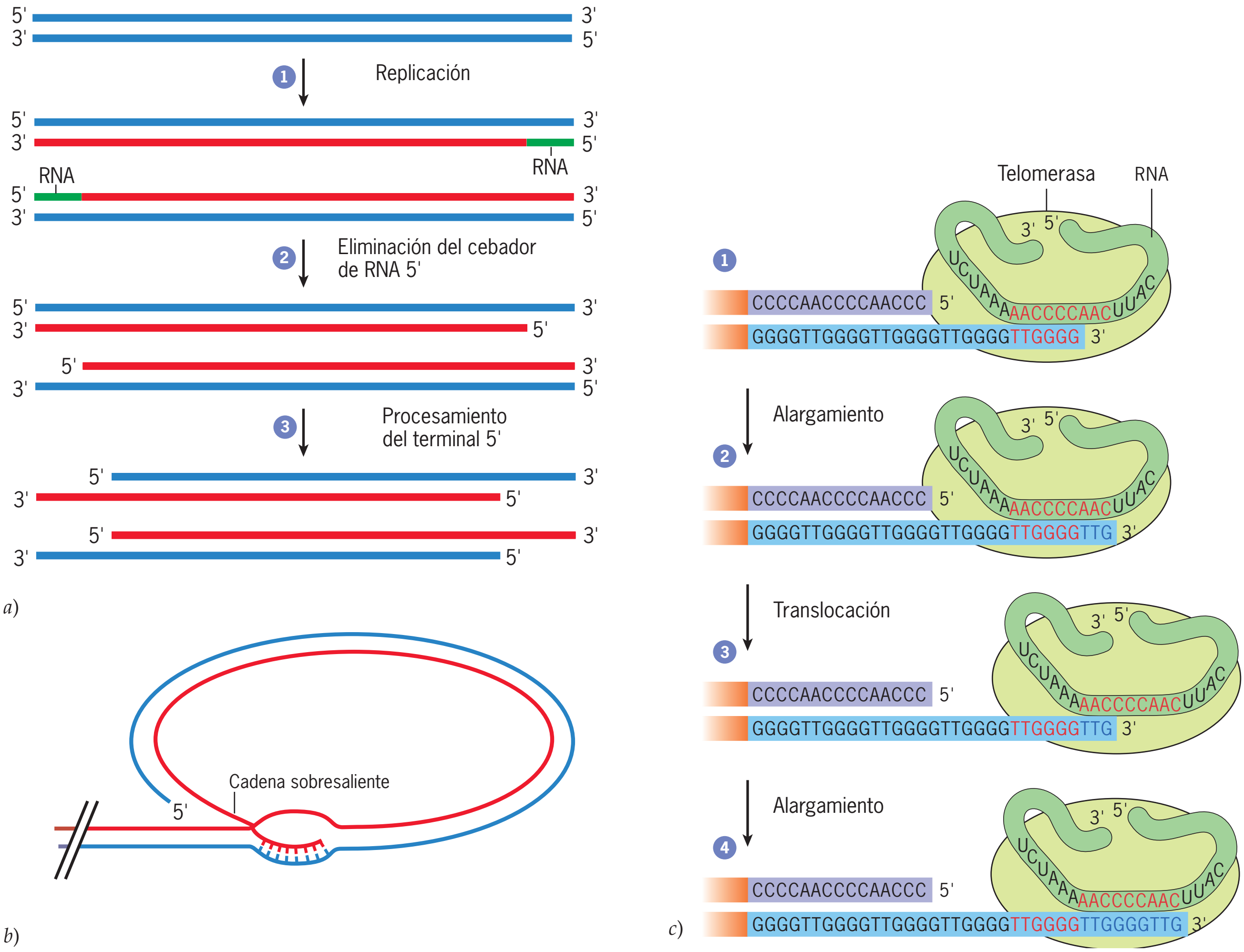



**FIGURA 12-24 El problema de replicación final y el papel de la telomerasa.** *a*) Cuando el DNA de un cromosoma se replica (paso 1), los extremos 5′ de las cadenas recién sintetizadas (rojo) contienen un segmento corto de RNA (verde), que había funcionado como un cebador para la síntesis del DNA adyacente. Una vez que se elimina este RNA (paso 2), el extremo 5′ del DNA se hace más corto en relación con el de la generación anterior. Los extremos 5′ en cada extremo del cromosoma se procesan adicionalmente mediante actividades de nucleasa (paso 3), lo que aumenta las longitudes del saliente de una sola cadena. *b*) El saliente de una sola cadena no permanece como una extensión libre, sino que invade el dúplex como se muestra aquí, desplazando una de las cadenas, que forma un asa. El asa es un sitio de unión para un complejo de proteínas específicas que bloquean los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas y regulan la longitud de los telómeros. *c*) Mecanismo de acción de la telomerasa. La enzima contiene una molécula de RNA que es complementaria al extremo de la cadena rica en G, que se extiende más allá de la cadena rica en C. El RNA de la telomerasa se une al extremo sobresaliente de la cadena rica en G (paso 1) y luego sirve como plantilla para la adición de nucleótidos en el extremo 3′ de la cadena (paso 2). Después de que se sintetiza un segmento de DNA, el RNA de la telomerasa se desliza hacia el nuevo extremo de la cadena que se alarga (paso 3) y sirve como molde para la incorporación de nucleótidos adicionales (paso 4). La brecha en la cadena complementaria se llena con las enzimas de replicación polimerasa α primasa (véase figura 13-21).

FUENTE: *c*) CW Greider y EH Blackburn, reimpreso con permiso de *Nature* 1989;337:336, copyright 1989. *Nature* by Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

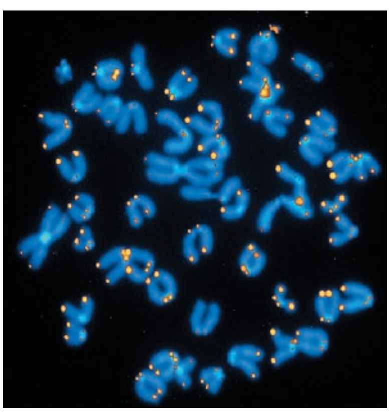


**FIGURA 12-25 Integridad de la telomerasa y el cromosoma.** Los cromosomas en esta micrografía son de la célula de un ratón que carece de un gen funcional para la enzima telomerasa. Los telómeros aparecen como manchas amarillas después de la hibridación *in situ* con una sonda de telómero marcada con fluorescencia. Algunos cromosomas carecen de telómeros por completo y varios cromosomas se han fusionado entre sí en sus extremos. La fusión cromosómica produce cromosomas con más de un centrómero, lo que a su vez conduce a la rotura cromosómica durante la división celular. La inestabilidad genética que resulta de la pérdida de un telómero puede ser una de las principales causas de que las células se vuelvan cancerosas.

FUENTE: Tomado de María A Blasco, *et al*. *Cell* 1997; portada # 1, vol. 91. Cortesía de Carol W Greider, con permiso de Elsevier.

formador de sangre para producir un número suficiente de células sanguíneas durante una vida humana normal.

Si los telómeros son un factor tan importante para limitar el número de veces que una célula puede dividirse, se podría esperar que el acortamiento de los telómeros sea un factor significativo en el envejecimiento humano normal. Un gran cuerpo de investigación apoya esta propuesta. De hecho, algunos biólogos describen la longitud de los telómeros como un tipo de "reloj de la longevidad", que proporciona una medida de cuán rápido un individuo en particular está envejeciendo desde el punto de vista biológico, en lugar de cronológico. Además de la edad, el estrés psicológico puede ser un importante regulador de la longitud de los telómeros. Múltiples estudios han encontrado que las personas que experimentan estrés psicológico crónico, así como un trauma infantil temprano, muestran una reducción estadísticamente significativa en la longitud de los telómeros. Estos estudios se basan, sobre todo, en niveles de estrés autoinformados y en algunos casos, aunque no en todos, implican un pequeño número de muestras, sin embargo, la idea de que la psicología humana podría afectar la biología molecular en el caso de los telómeros es tentadora y requiere una investigación más profunda. Varias compañías ahora brindan un servicio en el que miden la longitud de los telómeros en una muestra de células sanguíneas de una persona, pero aún no se sabe si esas pruebas proporcionarán una evaluación útil del riesgo que corre un individuo de padecer enfermedades relacionadas con la edad o con el estrés.

Incluso si una persona con telómeros excepcionalmente largos envejeciera con mayor lentitud que una persona promedio, hay otro aspecto del problema a considerar. Una gran cantidad de evidencia indica que el acortamiento de los telómeros desempeña un papel clave en la protección de los humanos contra el cáncer, al limitar el número de divisiones de una célula tumoral potencial. Queda por determinar si una persona con telómeros más largos es susceptible en mayor medida al desarrollo de una enfermedad maligna grave. De todos modos, la relación entre el crecimiento del cáncer y los telómeros es un importante asunto de estudio. Las células malignas, por definición, son células que han escapado de los controles normales de crecimiento del cuerpo y continúan dividiéndose indefinidamente. ¿Cómo es que las células tumorales malignas pueden dividirse repetidamente sin quedarse sin telómeros y provocar su propia muerte? A diferencia de las células normales que carecen de actividad de telomerasa detectable, aproximadamente 90% de los tumores humanos consisten en células que contienen una enzima telomerasa activa.[4] Conforme a un escenario, el crecimiento de los tumores va acompañado de una intensa selección de células en las que la expresión de la telomerasa se ha reactivado. La gran mayoría de las células tumorales no expresan la telomerasa y mueren, mientras que las células raras que expresan la enzima se "inmortalizan". Esto no significa que la activación de la telomerasa, por sí misma, haga que las células se vuelvan malignas. Como se discute en el capítulo 16, el desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples etapas, en el cual las células, por lo general, desarrollan cromosomas anormales, cambios en la adhesión celular y la capacidad de invadir tejidos normales. El mantenimiento de los telómeros y la división celular ilimitada son, por tanto, sólo una propiedad de las células cancerosas. Pero sigue siendo una propiedad importante del cáncer, y si la telomerasa pudiera inhibirse en las células cancerosas, esta podría ser una forma efectiva de tratar una amplia gama de cánceres. Un inhibidor de la telomerasa llamado Imetelstat se encuentra en la actualidad en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de la trombocitemia, una enfermedad sanguínea caracterizada por la producción excesiva de plaquetas, y la mielofibrosis, una forma de leucemia crónica. Es interesante observar que los descubrimientos iniciales de las secuencias de DNA teloméricas y la telomerasa se llevaron a cabo en ***Tetrahymena***, la misma criatura de estanque unicelular explotada en el descubrimiento de las ribozimas (p. 425). ***Tetrahymena*** tiene una gran ventaja para estudiar los telómeros y la telomerasa utilizando métodos bioquímicos, ya que su genoma está organizado en un gran número de pequeños cromosomas, de modo que una sola célula contiene un número mucho mayor de telómeros que una célula típica de mamífero. Esto significa que es más fácil aislar la telomerasa de dicha célula, porque, en primer lugar, hay más de ella. Este punto sirve como otro recordatorio de que los descubrimientos de gran importancia médica a menudo se obtienen usando organismos modelo con características específicas o inusuales que hacen que un aspecto particular de la biología celular sea más fácil de estudiar.

## Centrómeros

Cada cromosoma representado en la figura 12-22 contiene un sitio donde las superficies exteRNA están notablemente indentadas. El sitio de la constricción marca el **centrómero** del cromosoma (**FIGURA 12-26**). En los seres humanos, el centrómero contiene una secuencia de DNA de 171 pares de base repetidos en tándem (llamada *DNA satélite* α) que se extiende por, al menos, 500 kilobases. Este tramo de DNA se asocia con proteínas específicas que lo distinguen de otras partes del cromosoma. Por ejemplo, la cromatina centromérica contiene una variante de histona H3 única, llamada CENP-A en los mamíferos, que reemplaza a H3 convencional en una cierta fracción de los nucleosomas centroméricos y les otorga a estos nucleosomas propiedades únicas. Durante la formación de los cromosomas mitóticos, los nucleosomas que contienen CENP-A se sitúan en la superficie externa del centrómero, donde sirven como plataforma para el ensamblaje del cinetocoro. El cinetocoro, a su vez, sirve como el sitio de unión para los microtúbulos que separan los cromosomas durante la división celular (véase figura 14-16). Los cromosomas que carecen de CENP-A no pueden ensamblar un cinetocoro y se pierden durante la división celular.

Se ha sugerido en capítulos anteriores que las secuencias de DNA responsables de las funciones celulares esenciales tienden a conservarse. Fue una sorpresa, por tanto, descubrir que el DNA centromérico exhibía marcadas diferencias en la secuencia de nucleótidos, incluso entre especies estrechamente relacionadas. Este hallazgo sugiere que la secuencia de DNA en sí misma no es un determinante importante de la estructura y la función del centrómero, una conclusión que está fuertemente respaldada por los siguientes estudios en humanos. Cerca de uno de cada 2 000 humanos nace con células que tienen un exceso de DNA cromosómico que forma un cromosoma diminuto adicional, llamado *cro-*

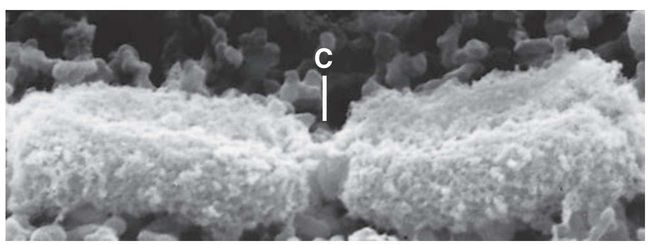



**FIGURA 12-26 Cada cromosoma mitótico tiene un centrómero cuyo sitio está marcado por una indentación distinta.** Micrografía electrónica de barrido de un cromosoma mitótico. El centrómero (C) contiene secuencias de DNA altamente repetitivas (DNA satélite) y una estructura que contiene unas proteínas llamadas cinetocoro que sirve como un sitio para la unión de microtúbulos del huso durante la mitosis y la meiosis (abordado en el capítulo 14).

FUENTE: Tomado de Jerome B Rattner. *Bioess* 1991;13:51, © 1991. Este material se usa con el permiso de John Wiley & Sons.

[4] El otro 10% aproximadamente tiene un mecanismo alternativo basado en la recombinación genética que mantiene la longitud de los telómeros en ausencia de telomerasa.

*mosoma marcador*. En algunos casos, los cromosomas marcadores están desprovistos de DNA satelital α, pero aún contienen una constricción primaria y un centrómero completamente funcional que permite que los cromosomas marcadores duplicados se separen normalmente en células hijas en cada división. Es evidente que alguna otra secuencia de DNA en estos cromosomas marcadores se "selecciona" como el sitio para contener CENP-A y otras proteínas centroméricas. El centrómero aparece en el mismo sitio en un cromosoma marcador en todas las células de la persona, lo que indica que la propiedad se transmite a los cromosomas hijos durante la división celular. En un estudio, se descubrió que los cromosomas marcadores se transmiten de forma estable a través de tres generaciones de miembros de la familia.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la diferencia de estructura y función entre los centrómeros y los telómeros de un cromosoma?



# 12.6 PERSPECTIVA HUMANA

## Aberraciones cromosómicas y trastornos humanos

Además de las mutaciones que modifican el contenido de información de un gen único, los cromosomas pueden estar sujetos a alteraciones más extensas que ocurren, de manera más común, durante la división celular. Las piezas de un cromosoma pueden perderse, o pueden intercambiarse segmentos entre diferentes cromosomas. Debido a que estas aberraciones cromosómicas siguen a una ruptura cromosómica, su incidencia se ve incrementada por la exposición a agentes que dañan el DNA, como infecciones virales, rayos X o sustancias químicas reactivas. Además, los cromosomas de algunos individuos contienen sitios "frágiles" que son particularmente susceptibles a la rotura. Las personas con ciertas afecciones hereditarias raras, como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi y la ataxia-telangiectasia, tienen cromosomas inestables que muestran una gran tendencia a la ruptura.

Las consecuencias de una aberración cromosómica dependen de los genes que se ven dañados y del tipo de célula en la que se produce. Si la aberración ocurre en una célula somática (no reproductiva), las consecuencias son generalmente mínimas, porque sólo unas pocas células del cuerpo suelen verse afectadas. En raras ocasiones, sin embargo, una célula somática que porta una aberración puede transformarse en una célula maligna, que puede convertirse en un tumor canceroso. Las aberraciones cromosómicas que ocurren durante la meiosis, en particular como resultado de un cruce anormal, pueden transmitirse a la siguiente generación. Cuando un cromosoma aberrante se hereda a través de un gameto, todas las células del embrión tendrán la aberración, lo que, por lo general, resulta letal durante el desarrollo. Existen varios tipos de aberraciones cromosómicas, entre las que se incluyen las siguientes:

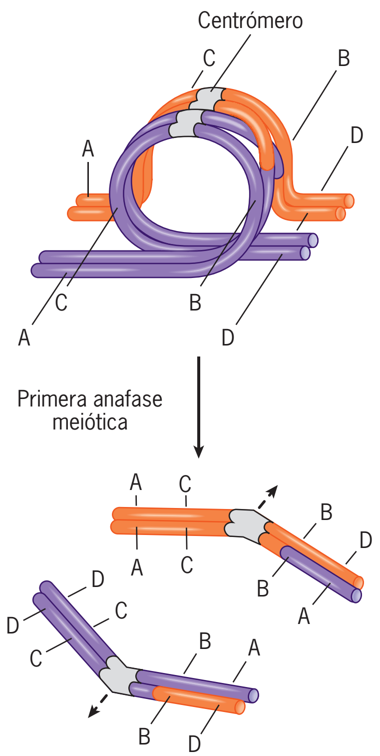



**FIGURA 1 Efecto de la inversión.** El entrecruzamiento entre un cromosoma normal (púrpura) y uno que contiene una inversión (naranja) suele ir acompañado de la formación de un asa. Los cromosomas que resultan del cruce contienen duplicaciones y deficiencias, que se muestran en los cromosomas en la primera división meiótica en la parte inferior de la figura.

- **Inversiones.** A veces, un cromosoma se rompe en dos lugares, y el segmento entre las roturas se vuelve a sellar en el cromosoma en orientación inversa. Esta aberración se llama inversión. Más de 1% de los humanos tiene una inversión que se puede detectar durante el cariotipo cromosómico (véase figura 10-30 *b*). Por lo general, un cromosoma que lleva una inversión contiene todos los genes de un cromosoma normal y, por tanto, el individuo no se ve afectado de manera adversa. Sin embargo, si una célula con una inversión cromosómica ingresa en la meiosis, el cromosoma aberrante no se puede emparejar correctamente con su homólogo normal debido a las diferencias en el orden de sus genes. En tales casos, el emparejamiento cromosómico suele ir acompañado de un asa (**FIGURA 1**). Si el entrecruzamiento ocurre dentro del asa, como se muestra en la figura, los gametos generados por la meiosis poseen una copia adicional de ciertos genes (una duplicación) o les faltan esos genes (una deleción). Cuando un gameto que contiene un cromosoma alterado se fusiona con un gameto normal en la fecundación, el cigoto resultante tiene un desequilibrio cromosómico y, a menudo, no es viable.
- **Translocaciones.** Cuando todo o una parte de un cromosoma se une a otro cromosoma, la aberración se denomina translocación (**FIGURA 2**). Al igual que las inversiones, una translocación que se produce en una célula somática generalmente tiene poco efecto sobre las funciones de esa célula o su progenie. Sin embargo, ciertas translocaciones aumentan la probabilidad de que la célula se vuelva maligna. El ejemplo mejor estudiado es el cromosoma Filadelfia, que se encuentra en las células malignas (pero no en las células

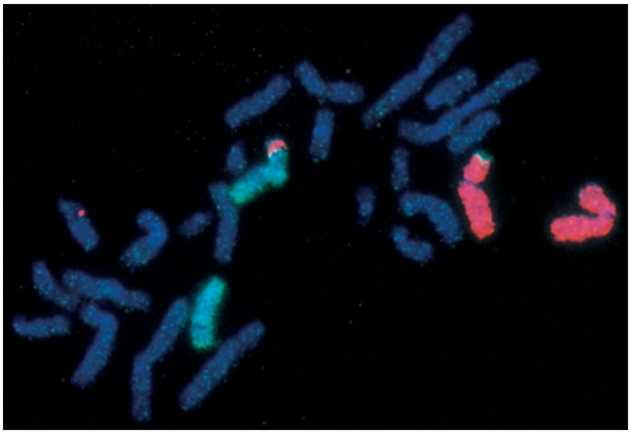


**FIGURA 2 Una translocación.** La micrografía muestra un conjunto de cromosomas humanos en los que el cromosoma 12 (azul brillante) ha intercambiado piezas con el cromosoma 7 (rojo). Los cromosomas afectados se han vuelto fluorescentes mediante hibridación *in situ* con una gran cantidad de fragmentos de DNA que son específicos para cada uno de los dos cromosomas implicados. El uso de estas "manchas" hace muy evidente cuando un cromosoma ha intercambiado piezas con otro cromosoma.

FUENTE: Cortesía del Laboratorio Lawrence Livermore. De una técnica desarrollada por Joe Gray y Dan Pinkel.

normales) de individuos con ciertas formas de leucemia. El cromosoma Filadelfia, que lleva el nombre de la ciudad en la que se descubrió en 1960, es una versión abreviada del cromosoma humano número 22. Durante años, se pensó que el segmento que faltaba representaba una eliminación simple, pero con técnicas mejoradas para observar cromosomas, la pieza genética faltante se encontró translocada a otro cromosoma (número 9). El cromosoma número 9 contiene un gen (ABL) que codifica una proteína cinasa que desempeña un papel en la proliferación celular. Como resultado de la translocación, un pequeño extremo de esta proteína es reemplazado por, aproximadamente, 600 aminoácidos adicionales codificados por un gen (BCR) transportado en la pieza translocada del cromosoma número 22. Esta novedosa "proteína de fusión" conserva la actividad catalítica del ABL original, pero ya no está sujeta a los mecanismos reguladores normales de la célula. Como resultado, la célula afectada se vuelve maligna y causa leucemia mielógena crónica (CML, *chronic myelogenous leukemia*). En general, se ha asumido que las translocaciones se producen después de la rotura aleatoria del DNA cromosómico. Estudios recientes, sin embargo, sugieren que tales rupturas en el DNA pueden ocurrir en sitios durante el proceso normal de transcripción, una actividad que puede hacer que el DNA sea más susceptible a la rotura. El cáncer de próstata, por ejemplo, se caracteriza por translocaciones que afectan a una serie de genes que se transcriben en las células prostáticas normales, en respuesta a las hormonas masculinas (andrógenos).

- Al igual que las inversiones, las translocaciones causan problemas durante la meiosis. Un cromosoma alterado por translocación tiene un contenido genético diferente de su homólogo. Como resultado, los gametos formados por meiosis contendrán copias adicionales de genes o se perderán genes. Se ha demostrado que las translocaciones tienen un papel importante en la evolución, puesto que generan cambios a gran escala que pueden ser fundamentales en la ramificación de líneas evolutivas separadas de un ancestro común. Tal incidente genético es posible que haya ocurrido durante nuestra propia historia evolutiva reciente. Una comparación de los 23 pares de cromosomas en las células humanas con los 24 pares de cromosomas en las células de los chimpancés, gorilas y orangutanes revela una sorprendente similitud. El examen detallado de los dos cromosomas de simios que no tienen contrapartida en los humanos revela que juntos son equivalentes, banda por banda, al cromosoma humano número 2 (**FIGURA 3**). En algún momento durante la evolución de los humanos, un cromosoma completo aparentemente se trasladó a otro, creando un único cromosoma fusionado y reduciendo el número haploide de 24 a 23.
- **Deleciones.** Una deleción ocurre cuando falta una porción de un cromosoma. Como se señaló antes, los cigotos que contienen una deleción cromosómica se producen cuando uno de los gametos es el resultado de una meiosis anormal. Perder una porción de un cromosoma a menudo resulta en una falta de genes cruciales, lo que provoca consecuencias graves, incluso si el cromosoma homólogo del individuo es normal. La mayoría de los embriones humanos que tienen una pérdida significativa no se desarrollan a término, y aquellos que sí, tienen una variedad de malformaciones. La primera correlación entre un trastorno humano y una supresión cromosómica fue hecha en 1963 por Jerome Lejeune, un genetista francés que había revelado con anterioridad la base cromosómica del síndrome de Down. Lejeune descubrió que a un bebé nacido con una variedad de malformaciones faciales le faltaba una porción del cromosoma 5. Un defecto en la laringe (caja de la voz) hacía que el llanto del bebé se asemejara al sonido de un gato que sufre. En consecuencia, los científicos lo denominaron síndrome del cri-du-chat, que significa síndrome del llanto del gato.
- **Duplicaciones.** Una duplicación ocurre cuando se repite una porción de un cromosoma. El papel de las duplicaciones en la formación de familias multigenéticas se discutió en la página 390. Las duplicaciones de cromosomas más sustanciales crean una condición en la que varios genes están presentes en tres copias, en lugar de las dos copias normalmente presentes (una condición llamada trisomía parcial). Las actividades celulares son muy sensibles al número de copias de genes y, por tanto, las copias adicionales de genes pueden tener graves efectos nocivos.

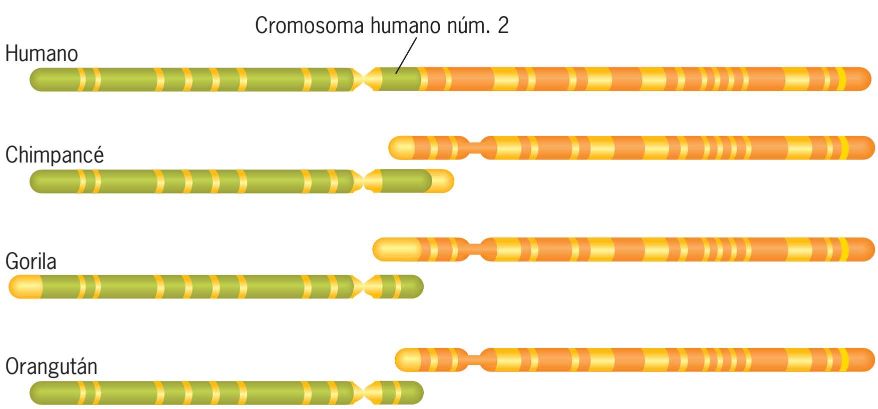



**FIGURA 3 Translocación y evolución.** Si los dos únicos cromosomas de simios que no tienen contrapartida en humanos están hipotéticamente fusionados, coinciden con el cromosoma humano número 2, banda por banda.

## 12.7 Epigenética: hay más para heredar que DNA



Como se describe en la sección 12.5, el DNA satélite α no es necesario para el desarrollo de un centrómero. De hecho, se han encontrado docenas de secuencias de DNA no relacionadas en los centrómeros de los cromosomas marcadores. No es el DNA el que marca indeleblemente el sitio como un centrómero, sino la cromatina que contiene CENP-A localizada allí. Estos hallazgos plantean un problema mayor. No todos los rasgos heredados dependen de las secuencias de DNA. A la herencia que no está codificada en el DNA se le denomina **epigenética** y no *genética*. La inactivación del cromosoma X que se analiza en la página 469 es otro ejemplo de un fenómeno epigenético: los dos cromosomas X pueden tener secuencias de DNA idénticas, pero una está inactivada y la otra no. Además, el estado de inactivación se transmite desde cada célula a sus hijas a lo largo de la vida de la persona. Sin embargo, a diferencia de la herencia genética, un estado epigenético generalmente se puede revertir; el cromosoma X, por ejemplo, se reactiva antes de la formación de gametos.

Los biólogos han tenido dificultades para comprender 1) los mecanismos por los que se almacena la información epigenética y 2) los mecanismos mediante los cuales se puede transmitir un estado epigenético de una célula a otra y de un padre a su descendencia. En esta discusión, se colocará el foco de atención en un tipo de fenómeno epigenético: el estado de la actividad genética de una célula. Considere una célula madre que reside en la base de la epidermis (como en la figura 7-1). Ciertos genes en estas células son transcripcionalmente activos y otros están reprimidos, y es importante que este patrón característico de actividad genética se transmita de una célula a sus hijas. Sin embargo, no todas las células hijas continúan la vida como células madre; algunas de ellas adquieren un nuevo compromiso y comienzan el proceso de diferenciación en células epidérmicas maduras. Este paso requiere un cambio en el estado transcripcional de esa célula. La atención reciente se ha centrado en el código de histonas (p. 470) como un factor crítico tanto en la determinación del estado transcripcional de una región particular de la cromatina, como en su transmisión a generaciones celulares posteriores.

Cuando el DNA de una célula se replica, las histonas asociadas con el DNA como parte de los nucleosomas se distribuyen de manera aleatoria a las células hijas junto con las moléculas de DNA. Como resultado, cada cadena de DNA hija recibe aproximadamente la mitad de las histonas nucleares que se asociaron con la cadena parental (véase figura 13-23). La otra mitad de las histonas nucleares que se asocian con las cadenas de DNA hija se reclutan de un grupo de moléculas de histona recién sintetizadas. Se cree que las modificaciones presentes en las colas de histonas en la cromatina parental determinan las modificaciones que se introducirán en las histonas recién sintetizadas en la cromatina hija. En la página 472 se vio, por ejemplo, que las regiones heterocromáticas de la cromatina tienen residuos metilados de lisina en la posición 9 de la histona H3. La enzima responsable de esta reacción de metilación está presente como uno de los componentes de la heterocromatina. A medida que se replica la heterocromatina, se piensa que esta histona metiltransferasa metila las moléculas H3 recién sintetizadas que se incorporan a los nucleosomas hijos. De esta manera, el patrón de metilación H3 de la cromatina y, por consiguiente, su estado heterocromático condensado, se transmite desde la célula parental a su descendencia. En contraste, las regiones eucromáticas tienden a contener colas H3 acetiladas, y esta modificación también se transmite desde la cromatina parental hasta la cromatina progenie, que puede servir como mecanismo epigenético mediante el cual las regiones eucromáticas activas se perpetúan en las células hijas. Las modificaciones de histona representan un portador de información epigenética, las modificaciones covalentes al DNA son de otro tipo. Este último tema se retoma en la página 500.

Los cambios inapropiados en el estado epigenético están asociados con numerosas enfermedades. También hay evidencia que sugiere que las diferencias en la apariencia física, la susceptibilidad a la enfermedad y la longevidad entre gemelos genéticamente idénticos pueden deberse, en parte, a las diferencias epigenéticas que aparecen entre ellos mientras envejecen. Se presume que algunas de estas diferencias en los *epigenomas* de gemelos idénticos se deben a disparidades en las condiciones ambientales que los individuos han experimentado, y otras son simplemente consecuencias de diferencias aleatorias que se introducen durante las muchas divisiones celulares que ocurren en la vida humana.

**REPASO**

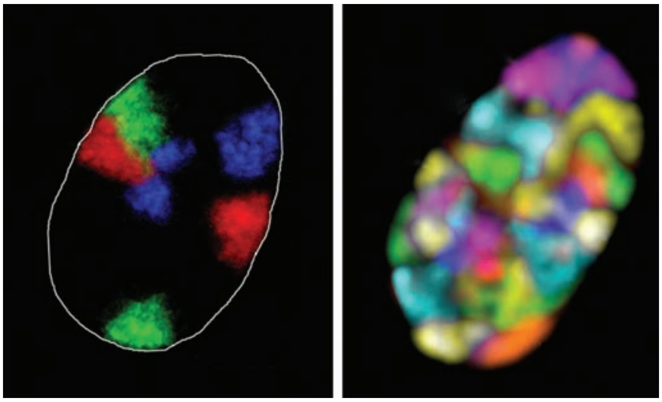
1. ¿Cuál es la diferencia entre la variación genética y la epigenética? Nombre una forma importante de variación epigenética basada en una modificación de histonas.

## 12.8 El núcleo como un organelo organizado

El examen del citoplasma de una célula eucariota bajo el microscopio electrónico revela la presencia de una gran variedad de organelos membranosos y elementos del citoesqueleto. El examen del núcleo, por otro lado, normalmente revela poco más que grupos dispersos de cromatina y uno o más nucleolos irregulares. Como resultado, los investigadores se quedaron con la impresión de que el núcleo es, en gran medida, un "saco" de componentes colocados al azar. Con el desarrollo de nuevas técnicas microscópicas, incluida la hibridación fluorescente *in situ* (FISH, *fluorescence* in situ *hybridization*, p. 386) y la obtención de imágenes de células marcadas con GFP en vivo (p. 697), se hizo posible localizar *loci* genéticos específicos dentro del núcleo de interfase. Se hizo evidente a partir de estos estudios que el núcleo mantiene un orden considerable. Por ejemplo, las fibras de cromatina de un cromosoma de interfase dado no se esparcen por el núcleo como un cuenco de espagueti, sino que se concentran en un territorio distinto que no se superpone extensamente con los territorios de otros cromosomas (**FIGURA 12-27**).

La localización dentro del núcleo de un territorio cromosómico dado puede no ser del todo aleatoria. En la micrografía mostrada en la **FIGURA 12-28**, la cromatina que comprende el cromosoma humano número 18 (mostrado en verde) ocupa un territorio cerca de la periferia del núcleo, mientras que la cromatina del cromosoma número 19 (mostrada en rojo) se localiza más centralmente dentro del organelo. Esta diferencia en la ubicación nuclear puede estar relacionada con los niveles de actividad de estos dos cromosomas: el cromosoma número 18 está relativamente desprovisto de genes, mientras que el cromosoma número 19 es rico en secuencias de proteínas de codificación, muchas de las cuales se transcriben presumiblemente en estas células. Se observa una disposición similar en los núcleos de las mujeres, donde el cromosoma X inactivo se encuentra en un borde del núcleo y el cromosoma X activo está situado internamente (figura 12-17*a*).

Aunque normalmente los genes se transcriben mientras residen dentro de sus territorios, las fibras de cromatina individuales pueden extenderse desde estos territorios a distancias considerables. Además, las secuencias de DNA que participan en una respuesta biológica común, pero que residen en cromosomas dife-



*a*) *b*)

**FIGURA 12-27 Territorios cromosómicos.** *a*) Tres y *b*) todos los 23 pares de cromosomas humanos se detectaron mediante análisis por hibridación fluorescente *in situ*, similar al descrito en la figura 12-22*b*), que permite que cada cromosoma humano se distinga de otros y se represente por un color identificable. Se encuentra que cada cromosoma ocupa un territorio distinto dentro del núcleo.

FUENTE: *a*) Tomado de Michael R Hubner y David L Spector, cortesía de Irina Solovei; *b*) Tomado de Michael R Hubner y David L Spector, cortesía de Irina Solovei y Andreas Bolzer, *Annual Review of Biphysics* 2010;471(39), fig. 1. Reproducido con permiso de Annual Reviews, Inc.

rentes, al parecer pueden unirse dentro del núcleo, donde pueden influir en la transcripción genética. Las interacciones entre diferentes *loci* se han revelado mediante la invención de una variedad de técnicas que implican la "captura de conformación del cromosoma (3C)". En este enfoque, las células se fijan mediante tratamiento con formaldehído, lo que causa secuencias de DNA que residen en estrecha proximidad dentro del núcleo para unirse de forma cruzada covalentemente entre sí (se dice que son "capturadas"). Después del proceso de fijación, el DNA se aísla y se somete a digestión mediante enzimas de restricción (sección 18-20), y los productos de la digestión se analizan para determinar qué secuencias de DNA en el genoma interactúan con una secuencia de DNA dada (la secuencia "cebo") en el tiempo de la fijación. Por ejemplo, es posible que el investigador desee saber qué secuencias de DNA interactúan a través del genoma con el *locus* de globulina β durante la diferenciación de los eritrocitos en la médula ósea. Las secuencias de DNA que se encuentran para interactuar usando esta técnica son, por lo general, secuencias que están presentes en el mismo cromosoma. Esto es lo que se esperaría, por ejemplo, entre un potenciador y un promotor para el mismo gen, que se acercan mucho a lo que se muestra en la figura 12-48. Pero, también se han encontrado numerosos ejemplos en los que las secuencias de DNA que interactúan están presentes en diferentes cromosomas. Un buen ejemplo de tales interacciones entre cromosomas proviene de un estudio en el que se trataron células de mama humanas cultivadas (versiones tanto normales como malignas) con la hormona estrógeno (**FIGURA 12-29**). El estrógeno induce la transcripción de un gran número de genes blanco mediante su unión a un receptor de estrógeno (ER α). Dos de los genes blanco de los estrógenos en los humanos son *GREB1*, ubicado en el cromosoma 2, y *TFF1*, ubicado en el cromosoma 21. Antes de tratar las células con estrógeno, los territorios de los cromosomas 2 y 21 se encontraban en lugares distantes entre sí, y los *loci* de los genes *GREB1* y *TFF1* estaban escondidos dentro del interior de sus respectivos territorios cromosómicos (figura 12-29*a*). Sin embargo, pocos minutos después de que las células se expusieran al estrógeno, estos dos territorios cromosómicos volvieron a colocarse en estrecha proximidad física entre sí, y los dos *loci* genéticos se agruparon en la periferia de sus territorios (figura 12-29*b*). Estos estudios respaldan la idea de que los genes se mueven físicamente a sitios dentro del núcleo llamados fábricas de transcripción, donde se concentra la maquinaria de transcripción, y que los genes implicados en la misma respuesta tienden a localizarse en la misma fábrica (figura 12-29*c*). Varias investigaciones sugieren que el movimiento de los loci cromosómicos dentro del núcleo está impulsado por las interacciones actina-miosina. Versiones más elaboradas de la técnica de captura de conformación del cromosoma, conocidas como 5C y Hi-C, permiten analizar interacciones para muchas regiones genómicas diferentes al mismo tiempo y han demostrado la presencia de miles de interacciones de asas de rango largo, la mayoría de las cuales involucran interacciones de genes con promotores localizados aproximadamente 100 kb corriente arriba. Se han ideado técnicas matemáticas para utilizar tales datos de interacción de todo el genoma, combinadas con modelos físicos de plegamiento de polímeros, para calcular la disposición estructural más probable del genoma dentro del núcleo (**FIGURA 12-30**). El principal resultado hasta ahora de tales estudios es que el genoma se empaqueta en una serie de regiones, de cientos de kb de tamaño, de manera que el DNA dentro de dicha región tiende a interactuar mucho más fuertemente con otro DNA en la misma región, que con otras partes del genoma. Estas regiones se conocen como dominios topológicamente asociados (TADs, *topologically associated domains*). Si bien se plantea la hipótesis de que los genes contenidos en un TAD podrían estar regulados de forma coordinada, el impacto real de estos niveles superiores de organización del genoma en la expresión genética aún no se comprende bien y es un área importante de la investigación actual.

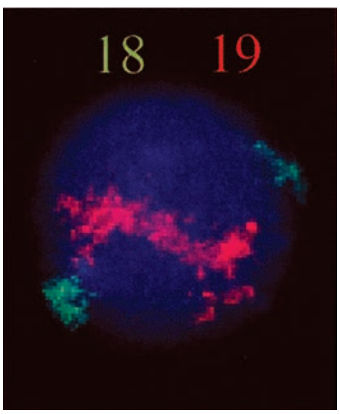



**FIGURA 12-28 Localización de cromosomas específicos dentro de un núcleo interfásico.** Micrografía del núcleo de un linfocito humano (teñido de azul) que se sometió a hibridación fluorescente *in situ* de doble etiqueta para visualizar los cromosomas números 18 y 19, que aparecen como verde y rojo, respectivamente. El cromosoma 19, que contiene una mayor densidad de genes que codifican proteínas que el cromosoma 18, tiende a ubicarse más al centro dentro del núcleo de la célula.

FUENTE: Tomado de Jenny A Croft, *et al*. *J Cell Biol* 1999;145:1119, fig. 1, cortesía de Wendy A Bickmore. Reproducido con permiso de la Rockefeller University Press.

Otro ejemplo de la interrelación entre la organización nuclear y la expresión genética se ilustra en la **FIGURA 12-31*a*)**. Esta micrografía muestra una célula que ha sido teñida con un anticuerpo fluorescente contra uno de los factores proteicos implicados en el empalme previo de RNAm. En lugar de distribuirse de manera uniforme a lo largo del núcleo, la maquinaria de procesamiento se concentra dentro de 20 a 50 dominios irregulares, denominados "motas". De acuerdo con la opinión actual, estos puntos funcionan como depósitos de almacenamiento dinámico que suministran factores de empalme para su uso en sitios cercanos de transcripción. El punto verde en el núcleo de la figura

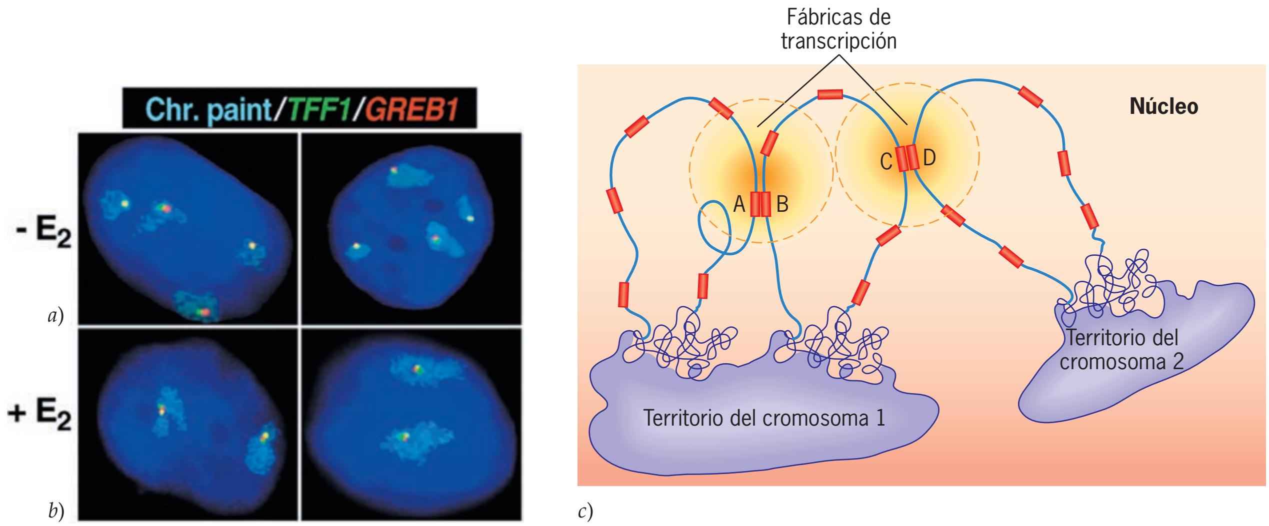



**FIGURA 12-29 Las interacciones pueden ocurrir entre genes distantes, en respuesta a estímulos fisiológicos.** *a*) Dos células derivadas de una línea de cáncer de mama que no han sido tratadas con hormonas. Los territorios del cromosoma 2 y 21, que se han marcado de forma fluorescente en cada célula, se colocan independientemente uno del otro dentro del núcleo. *b*) Dos de los mismos tipos de células de cáncer de mama se visualizaron 60 minutos después del tratamiento con estrógenos. Las interacciones entre territorios de los cromosomas 2 y 21 ahora son evidentes. El examen de cerca muestra la localización del *locus TFF1* (en verde) en el cromosoma 21 y el *locus GREB1* en el cromosoma 2 (en rojo). En este estudio, alrededor de la mitad de las células tratadas con hormonas exhibieron interacciones bialélicas (es decir, ambos alelos TFF1 que interactúan con alelos GREB1) como se describe aquí. *c*) Dibujo que ilustra cómo los genes en diferentes regiones del mismo cromosoma (A y B), o en diferentes cromosomas (C y D), pueden unirse dentro del núcleo. En algunos casos, las secuencias de DNA de *loci* distantes pueden influir mutuamente en la actividad de transcripción, y en otros casos, estos genes distantes pueden, simplemente, compartir un conjunto común de proteínas involucradas en el proceso de transcripción.

FUENTE: *a*, *b*) Tomado de Qidong Hu, *et al*. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 2008;105:19200, fig. 2b y 2c. © 2008, Academia Nacional de Ciencias, Estados Unidos. Cortesía de Michael G. Rosenfeld.

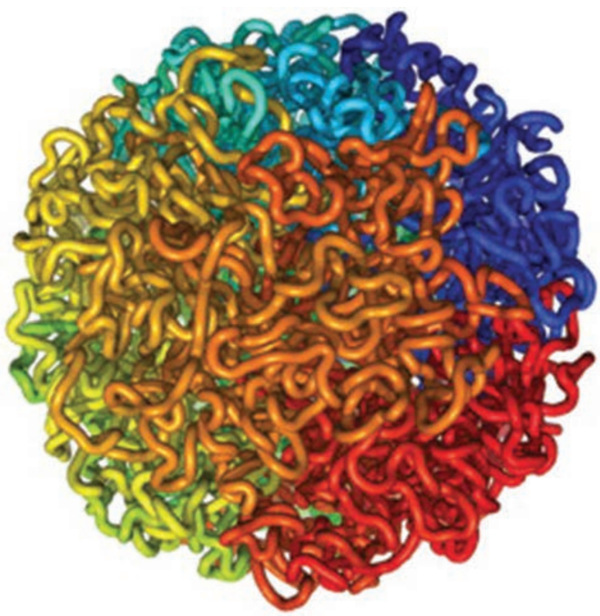


**FIGURA 12-30 Empaquetado global del genoma dentro del núcleo.** Al combinar las mediciones de las interacciones cromosómicas de Hi-C con modelos físicos de polímeros, ha sido posible reconstruir modelos de cómo el genoma humano se empaqueta dentro del núcleo. La imagen aquí muestra un modelo teórico conocido como glóbulo fractal que predice con exactitud las características estadísticas de los resultados Hi-C, lo que sugiere que tal disposición puede representar la organización del genoma en la escala en megabase.

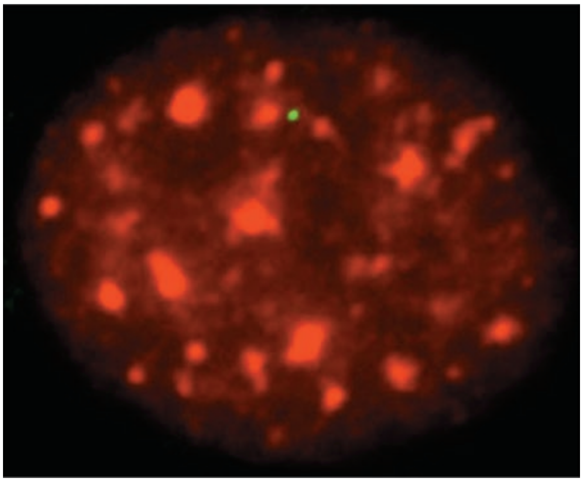
FUENTE: Tomado de Erez Lieberman-Aiden, *et al*. *Science* 2009;326:289-293, reproducido con permiso de AAAS.

12-31*a*) es un gen viral que se transcribe cerca de una de las motas. Las micrografías de la figura 12-31*b*) muestran un rastro de factores de corte y empalme que se extienden desde un dominio de moteado hacia un sitio cercano donde la síntesis de pre-mRNA se ha activado recientemente. Las diversas estructuras del núcleo, incluidos los nucléolos y las motas, son compartimientos dinámicos y en estado estacionario con sus partes componentes que se mueven de manera constante dentro y fuera de las estructuras. Si esa actividad está bloqueada, el compartimiento simplemente desaparece, a medida que sus materiales se dispersan en el nucleoplasma.

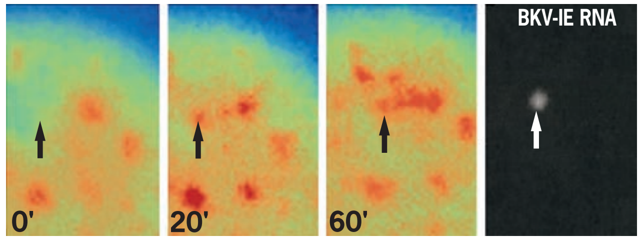
Además de nucléolos y motas, a menudo se observan bajo el microscopio otros varios tipos de cuerpos nucleares (p. ej., cuerpos de Cajal, GEMs y cuerpos de PML). Cada uno de estos cuerpos nucleares contiene un gran número de proteínas que entran y salen de la estructura de manera dinámica. Debido a que ninguno de estos cuerpos nucleares está encerrado por una membrana, no se requieren mecanismos de transporte especiales para estos movimientos a gran escala. Se han atribuido varias funciones a estas estructuras nucleares, pero siguen estando mal definidas. Además, parece que no son esenciales para la viabilidad celular, por lo que no serán más tema de análisis.

## REPASO

1. Describa algunas de las observaciones que sugieren que el núcleo es un compartimiento ordenado.



*a*) 2 µm




*b*) 1.5 µm

**FIGURA 12-31 Compartimentación nuclear de la maquinaria de procesamiento de mRNA de la célula.** *a*) El núcleo de una célula teñida con anticuerpos fluorescentes contra uno de los factores implicados en el procesamiento de premRNA. La maquinaria de procesamiento de mRNA está localizada en, aproximadamente, 30 a 50 sitios discretos, o "motas". La célula que se muestra en esta micrografía se ha infectado con citomegalovirus, cuyos genes (que se muestran como un punto verde) se transcriben cerca de uno de estos dominios. *b*) Las células cultivadas se transfectaron con un virus, y la transcripción se activó mediante la adición de AMP cíclico. Las imágenes se ven en varios momentos después de la activación transcripcional. El sitio de transcripción del genoma viral en esta célula está indicado por las flechas. Este sitio se reveló al final del experimento mediante la hibridación del RNA viral con una sonda marcada con fluorescencia (indicada por la flecha blanca en el cuarto marco). Los factores de empalme de premRNA (naranja) forman un rastro de las motas existentes en la dirección de los genes que se transcriben.

FUENTE: *a*) Tomado de Tom Misteli y David L Spector. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:324, con permiso de Elsevier; *b*) De Tom Misteli, Javier F Caceres y David L Spector. *Nature* 1997;387:525, reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

## 12.9 Descripción general de la regulación genética en eucariotas

Además de poseer un genoma que contiene decenas de miles de genes, las plantas y animales complejos se componen de muchos tipos diferentes de células. Los vertebrados, por ejemplo, están compuestos por cientos de tipos de células distintas, cada una mucho más compleja que una célula bacteriana y cada una requiere una batería distinta de proteínas y RNA que le permiten llevar a cabo actividades especializadas. Los investigadores lucharon durante muchos años para demostrar que cada célula en un organismo multicelular complejo contenía todos los genes necesarios para convertirse en cualquier otra célula en ese organismo. A fines de la década de 1950, finalmente dos investigadores, uno que trabajaba con plantas y otro, con animales, obtuvieron una convincente evidencia de esta hipótesis ampliamente aceptada. Uno de estos experimentos clave fue llevado a cabo por Frederick Steward y sus colegas de la Universidad de Cornell, quienes demostraron que una célula de la raíz de una planta madura aislada podría inducirse para convertirse en una planta completamente desarrollada, que contuviera todos los tipos de células presentes normalmente. En el segundo experimento, John Gurdon, de la Universidad de Oxford, probó que se podía extraer un núcleo de una célula intestinal diferenciada de un renacuajo de *Xenopus*, trasplantarlo a un huevo cuyo propio núcleo había sido destruido, y que el óvulo receptor que contenía el núcleo del donante podía convertirse en un anfibio adulto normal. Se demostró que todos los núcleos presentes en este animal clonado se derivaban del núcleo tomado de la célula somática. En otro experimento histórico más reciente, el grupo de Ian Wilmot, en Escocia, pudo clonar una oveja (Dolly) mediante el trasplante de núcleos derivados de células cultivadas de la glándula mamaria en óvulos no fertilizados, cuyos cromosomas se habían eliminado (**FIGURA 12-32**). Estos experimentos establecieron que todo el conjunto de instrucciones genéticas están presentes en las células adultas y pueden apoyar el desarrollo de un organismo completo en las condiciones adecuadas. Desde el nacimiento de Dolly, los investigadores han clonado con éxito más de una docena de otros mamíferos, incluidos ratones, vacas, cabras, cerdos, conejos y gatos. Por tanto, no es la presencia o ausencia de genes en una célula lo que determina las propiedades de esa célula, sino cómo se utilizan esos genes. Esas células que se convierten en células hepáticas, por ejemplo, lo hacen porque expresan un conjunto específico de "genes hepáticos", mientras que, al mismo tiempo, reprimen aquellos genes cuyos productos no están implicados en la función hepática.

El éxito de los experimentos de clonación descritos antes llevó a la conclusión de que el estado transcripcional de una célula diferenciada, que a su vez depende del estado epigenético de su cromatina, no es irreversible. Durante un experimento de clonación, el núcleo de una célula diferenciada puede dejar de expresar los genes del tejido adulto del que se toma y comenzar a expresar selectivamente los genes que son apropiados para el óvulo activado en el que de pronto se encuentra. Se puede concluir, a partir de estos experimentos de clonación, que un núcleo de una célula diferenciada puede ser *reprogramado* por factores que residen en el citoplasma de su nuevo entorno. El tema de la expresión genética selectiva, que reside en el corazón de la biología molecular, ocupará el resto de este capítulo.

La célula bacteriana promedio contiene suficiente DNA para codificar cerca de 3 000 polipéptidos, de los cuales alrededor de un tercio se expresa normalmente en un momento determinado. Compare esto con una célula humana que contiene suficiente DNA (6 mil millones de pares de bases) para codificar varios millones de polipéptidos diferentes. Aunque la gran mayoría de este DNA en realidad no contiene información de codificación de proteínas, se estima que una célula típica de mamífero fabrica, al menos, 5 000 polipéptidos diferentes en un momento dado. Muchos de estos polipéptidos, como las enzimas de la glucólisis y los transportadores de electrones de la cadena respiratoria, se sintetizan prácticamente en todas las células del cuerpo. Al mismo tiempo, cada tipo de célula sintetiza proteínas que son únicas para ese estado diferenciado. Son estas proteínas, más que cualquier otro componente, las que le otorgan a cada tipo de célula sus características únicas.

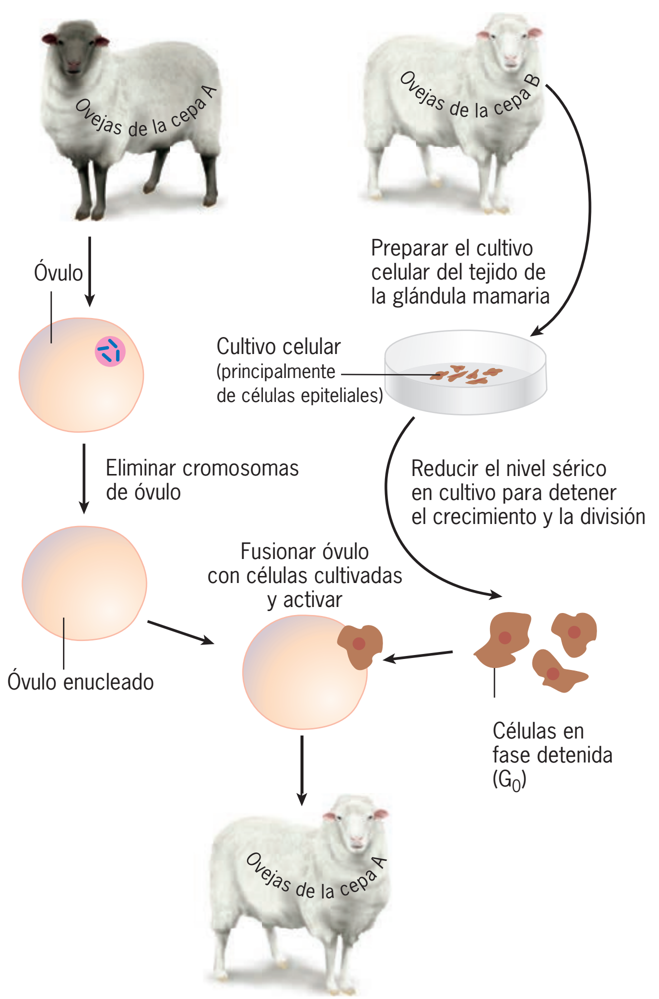



**FIGURA 12-32 La clonación de animales demuestra que los núcleos conservan un complemento completo de información genética.** En este experimento, un óvulo enucleado de una oveja de una raza se fusionó con una glándula mamaria de una hembra de otra raza. El óvulo activado se convirtió en un cordero saludable. Debido a que todos los genes en el cordero recién nacido debieron derivarse del núcleo de la célula mamaria (lo que se demostró mediante el uso de marcadores genéticos), este experimento confirma la creencia generalizada de que las células diferenciadas conservan toda la información genética originalmente presente en el cigoto. La principal dificultad que, por lo general, se encuentra en los experimentos de trasplante nuclear ocurre cuando el núcleo de una célula somática activa (no germinativa) se sumerge, de modo repentino, en el citoplasma de un óvulo relativamente inactivo. Para evitar dañar el núcleo del donante, las células cultivadas fueron forzadas a un estado inactivo (llamado G0), al reducir, de manera drástica el contenido de suero en el medio de cultivo.

Considere la situación que enfrenta un glóbulo rojo en desarrollo dentro de la médula de un hueso humano. De todos los cientos de tipos diferentes de células en el cuerpo humano, sólo aquellas en el linaje que conducen a los glóbulos rojos producen la proteína hemoglobina. Además, la hemoglobina representa más de 95% de la proteína de un glóbulo rojo, sin embargo, los genes que codifican los dos polipéptidos de hemoglobina representan menos de una millonésima parte del DNA total de la célula en desarrollo. La célula no sólo tiene que encontrar esta aguja genética en el pajar cromosómico, sino que debe regular su expresión a tal grado, que la producción de estos pocos polipéptidos se convierta en la actividad sintética dominante de la célula. Debido a que la cadena de eventos que conduce a la síntesis de una proteína particular incluye una serie de pasos discretos, hay varios niveles en los que se puede ejercer control. La regulación de la expresión genética en las células eucariotas se analizará en cuatro niveles distintos, como se ilustra en la descripción general de la **FIGURA 12-33**:

1. Los **mecanismos de control de la transcripción** determinan si un gen particular puede transcribirse y, de ser así, con qué frecuencia.
2. Los **mecanismos de control de procesamiento** determinan la vía por la cual la transcripción de mRNA primario (premRNA) se procesa en un RNA mensajero que se puede traducir en un polipéptido.
3. Los **mecanismos de control de la traducción** determinan si un mRNA en particular se traduce realmente y, de ser así, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo.
4. Los **mecanismos de control postraduccionales** regulan la actividad y la estabilidad de las proteínas.

En las siguientes secciones de este capítulo, se considerará cada una de estas estrategias regulatorias a su vez.

## REPASO

1. ¿Cuáles son los cuatro niveles en los que la expresión genética puede estar regulada en las células eucariotas?

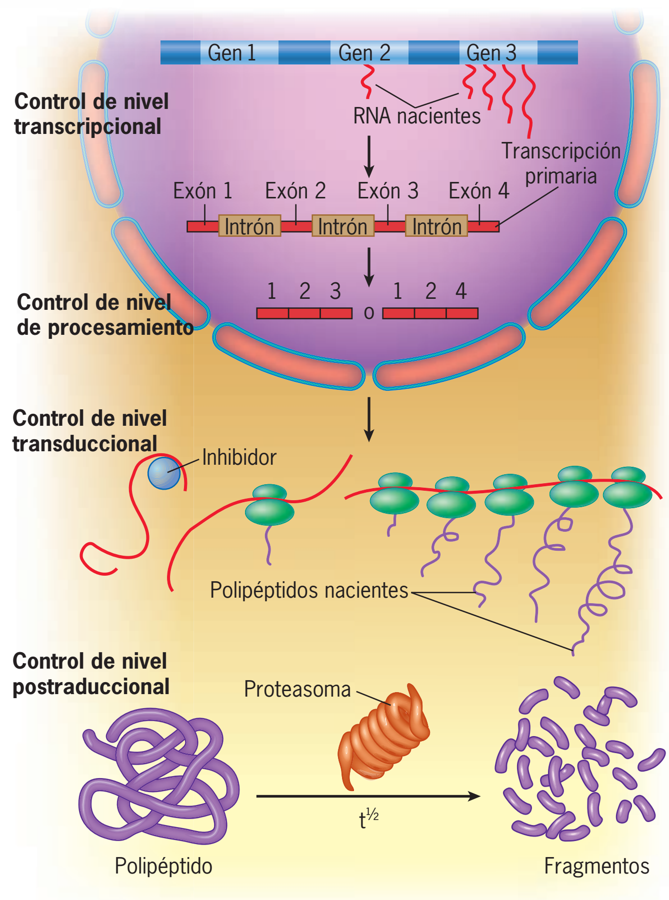



**FIGURA 12-33 Regulación de genes eucariotas.** Los controles de nivel transcripcional operan al determinar qué genes se transcriben y con qué frecuencia; los controles de nivel de procesamiento operan al determinar qué partes de las transcripciones primarias pasan a formar parte del conjunto de mRNA celulares; los controles de nivel transduccional regulan si un mRNA particular se traduce y, de ser así, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo, y los controles de nivel postransduccional determinan la longevidad de proteínas específicas.

## 12.10 Generación de perfiles de la actividad genética

Al igual que en las células procariotas, la transcripción genética diferencial es un mecanismo clave por el cual las células eucariotas activan o reprimen la expresión genética. Las células expresan diferentes genes en diferentes etapas de desarrollo embrionario, células en diferentes tejidos y células que están expuestas a diferentes tipos de estímulos. Un ejemplo de expresión genética específica de tejido se muestra en la **FIGURA 12-34**. En este caso, un gen que codifica una proteína específica del músculo se transcribe en las células de un embrión de ratón, lo que dará lugar al tejido muscular.

De vez en cuando se inventa una nueva tecnología que cambia básicamente la forma en que se abordan ciertos tipos de problemas en la biología. Dos de esas tecnologías son **microarray de DNA** (o "chips de DNA") y **secuenciación de RNA** (RNA-Seq, *RNA sequencing*). Estas técnicas permiten generar un perfil simultáneo de la actividad de todos los genes en un organismo o tipo de célula, a diferencia de las técnicas anteriores, que se limitaban en su mayoría a analizar sólo uno o algunos pocos genes a la vez. En ambos enfoques, el RNA primero se aísla de las células, tejidos u organismos completos, luego, las dos técnicas divergen, según los medios mediante los cuales se analizan los patrones de expresión genética.

### Microarrays de DNA

De inicio, se examinará el uso de un microarray para identificar genes que se expresan de manera diferente entre las cepas de levadura cultivadas, ya sea 1) en presencia de glucosa o 2) a medida que se agota la glucosa y la levadura comienza a utilizar etanol como fuente de carbono (**FIGURA 12-35**). La figura 12-35*a*) de esta imagen proporciona un resumen de los pasos básicos que se dan en este tipo de experimento; estos pasos pueden describirse brevemente de la siguiente manera:



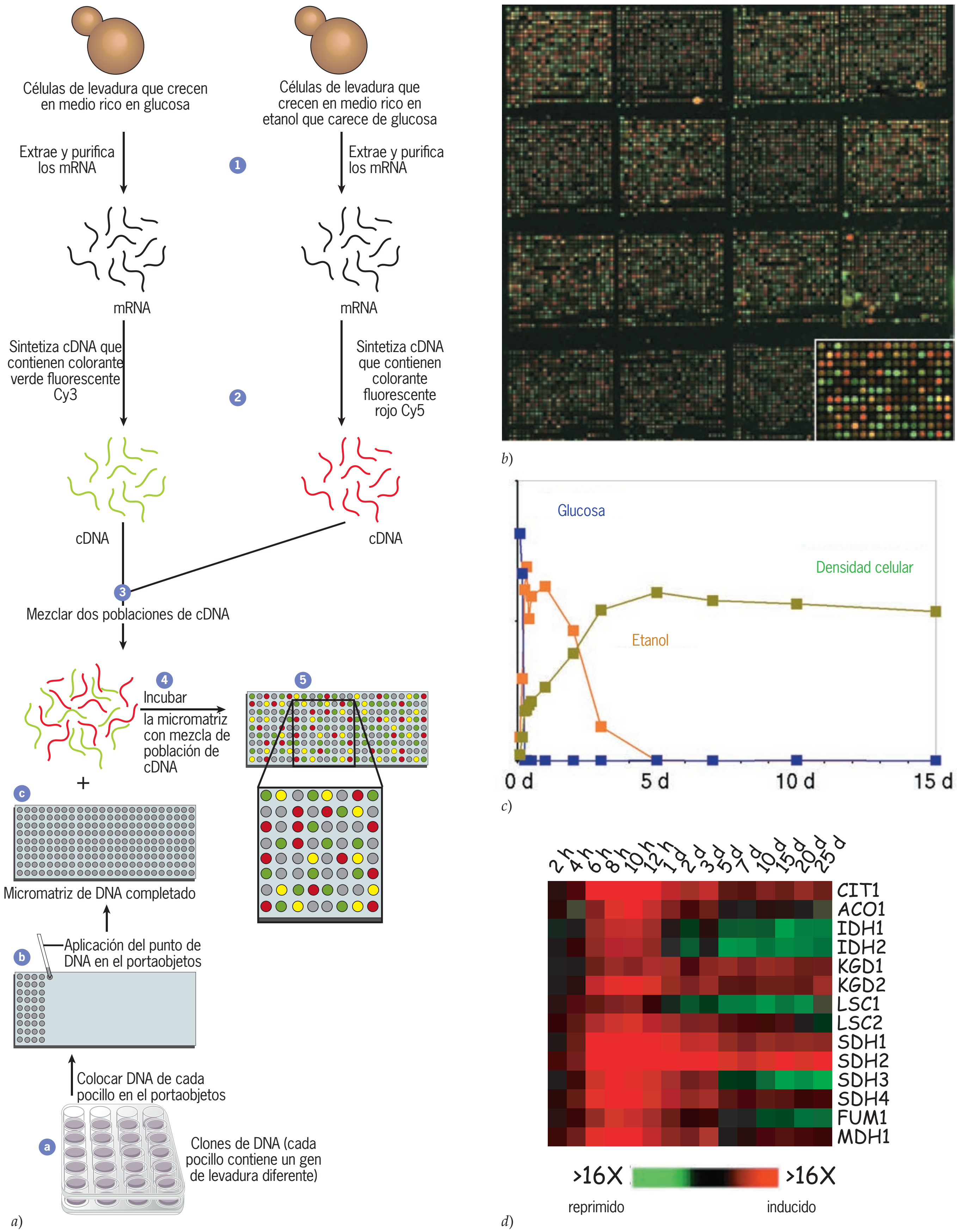
**FIGURA 12-34 Demostración experimental de la expresión genética específica tisular.** La transcripción del gen de la miogenina se activa específicamente en aquellas partes de este embrión de ratón de 11.5 días de vida (el miotoma de los somitas) que dará lugar al tejido muscular. La fotografía muestra un embrión de ratón transgénico que contiene la región reguladora del gen de la miogenina colocado corriente arriba de un gen de β-galactosidasa bacteriana, que actúa como informador. El gen de β-galactosidasa se emplea, por lo común, para controlar la expresión específica del tejido de un gen, porque la presencia de la enzima β-galactosidasa se revela con facilidad por el color azul que se produce en una simple prueba histoquímica. La activación de la transcripción, que resulta de los factores de transcripción que se unen a la región reguladora del gen de la miogenina, se ha producido en las células teñidas de azul.

FUENTE: Tomado de TC Cheng, *et al*. Cortesía de Eric N Olson. *J Cell Biol* 1992;119:1652, reproducido con permiso de la Rockefeller University Press.

1. Los fragmentos de DNA que representan los genes individuales que se estudiarán se generan utilizando las técnicas que se discuten en el capítulo 18. En el caso descrito en el paso *a*, en la parte inferior de la figura 12-35*a*), hay un pequeño volumen en cada pocillo de la placa que contiene un gen de levadura clonado específico. Los distintos pocillos contienen genes diferentes. Los DNA clonados se detectan, uno a la vez, en una matriz ordenada en un portaobjetos de vidrio, mediante un instrumento automático que entrega unos pocos nanolitros de una solución concentrada de DNA en un punto específico en el portaobjetos (paso *b*). En el paso *c*, se muestra una micromatriz de DNA completo. Usando esta técnica, se pueden detectar fragmentos de DNA de miles de genes diferentes o incluso genomas completos en ubicaciones conocidas en una superficie de vidrio.
2. Mientras tanto, los mRNA presentes en las células que se estudian se purifican (paso 1, figura 12-35*a*) y se convierten en una población de DNA complementarios (cDNA, *complementary DNA*) marcados con fluorescencia (paso 2). (El método para la preparación de cDNA se describe en la figura 18-46.) En el ejemplo ilustrado en la figura 12-35, y discutido a continuación, los cDNA se preparan a partir de dos poblaciones de células diferentes, una marcada con tinte verde fluorescente y la otra con tinte rojo fluorescente. Las dos preparaciones de cDNA marcadas se mezclan (paso 3) y luego se incuban con el portaobjetos que contiene el DNA inmovilizado (paso 4).
3. Aquellos DNA en la micromatriz que se hibridaron con un cDNA marcado se identifican mediante el examen del portaobjetos bajo un microscopio de fluorescencia (paso 5). Cualquier punto en la micromatriz que muestre fluorescencia representa un gen que ha sido transcrito en las células que se están estudiando.

La figura 12-35*b*) muestra los resultados reales de este experimento. Cada punto en la micromatriz de la figura 12-35*b*) contiene un fragmento de DNA inmovilizado de un gen diferente en el genoma de la levadura. Tomados en conjunto, los puntos contienen DNA de todos los, aproximadamente, 6 200 genes de codificación de proteínas presentes en una célula de levadura. Como se discutió antes, esta micromatriz de DNA particular se hibridó con una mezcla de dos poblaciones de cDNA diferentes. Una población de cDNA, que se marcó con un colorante fluorescente verde, se preparó a partir de los mRNA de células de levadura cultivadas en presencia de una alta concentración de glucosa. A diferencia de la mayoría de las células, cuando las células de levadura de panadero se cultivan en presencia de glucosa y oxígeno, obtienen su energía mediante glucólisis, convirtiendo rápidamente la glucosa en etanol (sección 03.10). La otra población de cDNA, que se marcó con un colorante fluorescente rojo, se preparó a partir de los mRNA de las células de levadura que crecían aeróbicamente en un medio rico en etanol, pero que carecía de glucosa. Las células que crecen en estas condiciones obtienen su energía mediante la fosforilación oxidativa, que requiere las enzimas del ciclo de TCA (p. 173). Las dos poblaciones de cDNA se mezclaron, se hibridaron con las sondas de DNA en la micromatriz, y el portaobjetos se examinó con un microscopio de fluorescencia. Los genes que están activos en uno u otro medio de crecimiento aparecen como manchas verdes o rojas en la micromatriz (paso 5, figura 12-35*a*,*b*). Estos puntos que permanecen desprovistos de color en la figura 12-35 representan genes que no se transcriben en estas células en ningún medio de crecimiento, mientras que aquellos puntos que tienen una fluorescencia amarilla representan genes que se transcriben en células en ambos tipos de medios. En el recuadro se muestra un detalle de una pequeña porción de la micromatriz.

Los resultados experimentales que se muestran en la figura 12-35*b* identifican los genes transcritos en células de levadura en dos condiciones de crecimiento diferentes. Pero igual de impor-




tante es que también proporcionan información sobre la abundancia de mRNA individuales en las células, que es proporcional a la intensidad de la fluorescencia de un punto. Un punto que muestra una fluorescencia verde muy fuerte, por ejemplo, representa un gen cuyas transcripciones son abundantes en células de levadura cultivadas en glucosa, pero se reprimen en células de levadura cultivadas en etanol. Las concentraciones de mRNA individuales pueden variar en más de 100 veces en las células de le-

**FIGURA 12-35 Micromatriz de DNA y análisis de la expresión genética.** *a*) Pasos en la construcción de una micromatriz de DNA. La preparación de los cDNA (es decir, DNA que representa los mRNA presentes en una célula) usados en el experimento se muestran en los pasos 1-3. La preparación de la micromatriz de DNA se muestra en los pasos *a-c*. La mezcla de cDNA se incuba con la micromatriz en el paso 4 y se muestra un resultado hipotético en el paso 5. La intensidad del color del punto es proporcional al número de cDNA que allí se encuentran. *b*) Resultados de un experimento que usa una mezcla de cDNA que representa mRNA transcritos de células de levadura (1) en presencia de glucosa (cDNA marcado con verde) y (2) en presencia de etanol, después de que se ha agotado la glucosa (cDNA marcado en rojo). Esos puntos que muestran fluorescencia amarilla corresponden a genes que se expresan en ambas condiciones de crecimiento. El recuadro de la esquina inferior derecha muestra un primer plano de una pequeña porción de la micromatriz. Los detalles de este experimento se discuten en el texto. c) Gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de glucosa y etanol en los medios y en la densidad celular durante el experimento. En un inicio, las células de levadura consumen glucosa, luego el etanol que produjeron por fermentación, y finalmente dejan de crecer después de agotar ambas fuentes de energía química. *d*) Cambios en la expresión de genes que codifican enzimas del ciclo TCA durante el transcurso del experimento. Cada fila horizontal representa el nivel de expresión de un gen particular en diferentes periodos. Los nombres de los genes se proporcionan a la derecha (véase figura 5-7 para las enzimas). Los cuadrados rojos brillantes indican el nivel más alto de expresión genética, los cuadrados verdes brillantes indican el nivel más bajo de expresión. La expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo de TCA se induce a medida que las células comienzan a metabolizar el etanol y se reprime cuando se ha agotado el etanol.

FUENTE: *b-c*): Cortesía de Patrick O Brown. Véase Joseph DeRisi, *et al*. *Science* 1997;278:680 y Tracy L Ferea y Patrick O Brown. *Curr Opin Gen Develop* 1999:715. Current Opinion in Genetics & Development por Elsevier Ltd. Reproducido con permiso de Elsevier Ltd. en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center; *d*) Cortesía de Patrick O Brown.

vadura. La técnica es tan sensible que se puede detectar un mRNA a un nivel de menos de una copia por célula.[5]

La figura 12-35*c* muestra los cambios en la concentración de glucosa y etanol en el transcurso de un experimento. La glucosa se metaboliza con rapidez por las células de levadura, lo que lleva a la desaparición del azúcar en unas pocas horas. El etanol producido por la fermentación de la glucosa se metaboliza entonces de manera gradual por las células de levadura durante los próximos cinco días, hasta que finalmente desaparece del medio. La figura 12-35*d*) muestra los cambios en el nivel de expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo de TCA durante la marcha de este experimento. Los niveles de expresión de cada gen (marcados a la derecha) se muestran en intervalos de tiempo (marcados en la parte superior), usando tonos de rojo, para representar aumentos en la expresión, y tonos de verde, para representar disminuciones en la expresión. Es evidente que la transcripción de los genes que codifican las enzimas TCA se estimula cuando las células se adaptan al crecimiento en una fuente de carbono (etanol) que se metaboliza mediante la respiración aeróbica y luego se reprime cuando se agota el etanol.

En el presente, se está empleando la micromatriz de DNA para estudiar los cambios en la expresión genética que se producen durante una amplia variedad de eventos biológicos, como la división celular y la transformación de una célula normal en una célula maligna. Incluso es posible estudiar la diversidad de RNA producidos por una sola célula tumoral, una vez que los cDNA se amplifican por PCR. Ahora que se han secuenciado varios genomas eucariotas, los investigadores tienen una variedad ilimitada de genes cuya expresión se puede monitorear bajo diferentes condiciones.

[5] Las diferencias en la abundancia de mRNA probablemente reflejen las diferencias en la estabilidad del mRNA (p. 506), así como en las tasas de transcripción. En consecuencia, los resultados obtenidos de la micromatriz de DNA no pueden interpretarse únicamente sobre la base del control de nivel transcripcional.

## Secuenciación de RNA

En los últimos años, las micromatrices se suplantan gradualmente por una nueva tecnología llamada secuenciación de RNA (RNA-Seq) que depende de la secuenciación de pequeños fragmentos de cDNA derivados de RNA, que brindan la capacidad de analizar de manera global los patrones de expresión genética. En lugar de hibridar fragmentos de cDNA con chips de DNA, como se muestra en el experimento de micromatrices anteriores, los fragmentos de cDNA se secuencian directamente y luego se utilizan los enfoques computacionales para mapear los fragmentos de vuelta al genoma. Este enfoque permite a los investigadores identificar cada fragmento, volver a ensamblarlos en transcripciones completas y cuantificar los niveles exactos de cada una de las transcripciones de RNA, proporcionando un perfil de los patrones de expresión genética de las células que se estudian. Las últimas tecnologías de secuenciación permiten análisis precisos a partir de una sola célula valida de RNA.

La **FIGURA 12-36** muestra un experimento que combina micromatrices de DNA y secuenciación de RNA, para identificar genes expresados de manera diferencial entre líneas celulares de cáncer de mama que expresan el receptor de estrógeno (ER) o no.

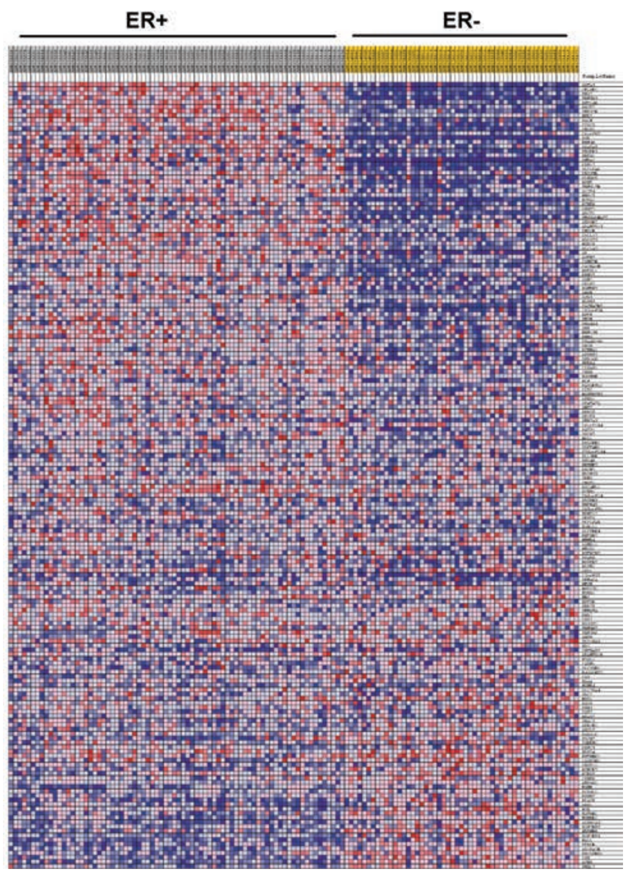



**FIGURA 12-36 Perfil de transcripción para personalizar la terapia de cáncer de mama.** Micromatrices y tecnologías de secuenciación de RNA se utilizaron para examinar los patrones de expresión de genes en 76 receptores de estrógenos positivos y 53 receptores de estrógenos negativos. Cada columna de pequeños cuadrados dentro de la micromatriz muestra los resultados de un solo paciente con cáncer. Los datos de pacientes ER+ se muestran a la izquierda y de pacientes ER– a la derecha. Se identificaron un total de 179 genes (enumerados en la columna a la derecha de la micromatriz) que se expresan diferencialmente entre los dos grupos. La capacidad de definir un retrato molecular de los tumores que responderán a la terapia hormonal puede personalizar el tratamiento del cáncer de mama.

FUENTE: Tomado de Zhifu Sun, *et al*. Cortesía de E. Aubrey Thompson. *PLoS ONE 6* 2011;E17490.

Esto es importante, porque los protocolos de tratamiento difieren en dependencia de si un cáncer de mama en particular expresa ER. Los resultados experimentales que se muestran en la figura 12-36 examinaron 129 tumores diferentes de cáncer de mama, para la expresión de 149 genes que se segregan entre los tumores ER– y ER+. Las diferencias están representadas por cambios en azul (baja expresión) o rojo (expresión alta), y demuestran que tales análisis pueden identificar el genotipo de una biopsia de cáncer de mama, lo que brinda a los médicos la oportunidad de personalizar la terapia. Estos enfoques tecnológicos tienen muchos usos potenciales, además de proporcionar un retrato visual de la expresión genética. Por ejemplo, pueden usarse para determinar el grado de variación genética en poblaciones humanas o para identificar los alelos para genes particulares que un individuo porta. Se espera, algún día, que esta última información pueda aconsejar a las personas sobre las enfermedades a las que pueden ser susceptibles durante su vida, brindándoles la oportunidad de tomar medidas preventivas tempranas.

**REPASO**

1. ¿Qué pasos son similares en el análisis de micromatrices y la secuenciación de RNA, y qué pasos son diferentes?

## 12.11 Papel de los factores de transcripción en la regulación de la expresión genética

Se ha logrado un gran progreso al dilucidar cómo ciertos genes pueden transcribirse en una célula particular, mientras que otros genes permanecen inactivos. El control de la transcripción está orquestado por un gran número de proteínas, llamadas **factores de transcripción**. Como se discutió en el capítulo 11, estas proteínas se pueden dividir en dos clases funcionales: factores de transcripción generales, que se unen a los sitios centrales del promotor en asociación con la RNA polimerasa (p. 417), y factores de transcripción de secuencia específicos, que se unen a varios sitios reguladores de genes particulares. Este último grupo de factores de transcripción puede actuar como *activadores transcripcionales*, que estimulan la transcripción del gen adyacente, o *represores transcripcionales*, que inhiben la transcripción. Esta sección se centra sobre los activadores transcripcionales, cuyo trabajo consiste en unir sitios reguladores específicos dentro del DNA e iniciar el reclutamiento de una gran cantidad de complejos proteicos que provocan la transcripción real del propio gen.

Se conoce la estructura detallada de muchos factores de transcripción y cómo interactúan con sus secuencias de DNA blanco. Los genes individuales generalmente están controlados por muchos sitios reguladores de DNA diferentes, que se unen a una combinación de distintos factores de transcripción (**FIGURA 12-37**). Por el contrario, un solo factor de transcripción puede unirse a numerosos sitios alrededor del genoma, controlando así la expresión de una gran cantidad de genes diferentes. Cada tipo de célula tiene un patrón característico de transcripción genética, que está determinado por el complemento particular de los factores de transcripción contenidos en esa célula.

El control de la transcripción genética es compleja, regulado por la presencia de múltiples sitios de unión para los factores de transcripción y la afinidad de unión, por estos factores de transcripción, a cada secuencia. Los factores de transcripción han preferido los sitios de unión de alta afinidad. Una región en corriente arriba de un gen dado podría contener uno o más sitios preferidos de alta afinidad o sitios con una secuencia ligeramente diferente que se unen con una afinidad más baja. Por lo general, para activar la transcripción, se requiere de la unión de múltiples factores de transcripción. Un ejemplo de este tipo de interacción cooperativa entre factores de transcripción vecinos se ilustra en la **FIGURA 12-38** y se analiza, con más detalle, en la página 491. En cierto sentido, la región reguladora de un gen puede considerarse como un tipo de centro de integración para la expresión de ese gen. Las células expuestas a diferentes estímulos responden sintetizando diferentes factores de transcripción, que se unen a diferentes sitios en el DNA. El grado en que se transcribe un gen dado depende de la *combinación* particular de factores de transcripción unidos a los elementos reguladores en corriente arriba. Dado que alrededor de 5 a 10% de los genes codifican factores de transcripción, es evidente que es posible un número virtualmente ilimitado de combinaciones de interacciones entre estas proteínas. Cuando esto se conecta con el hecho de que los sitios de unión para estos factores varían de un gen a otro, la combinación de la presencia o ausencia de un factor dado y la afinidad de unión variable para cada factor permite la variación precisa en los

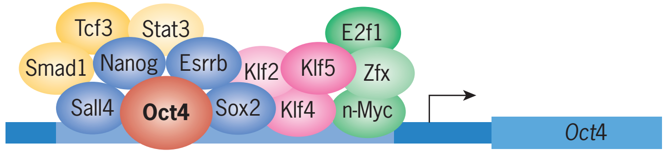



**FIGURA 12-37 Control combinatorio de la transcripción.** La transcripción del gen Oct4 requiere la acción de múltiples factores de transcripción que se unen corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Oct4 es el gen más importante (es decir, el menos prescindible) para mantener el estado pluripotente en las células madre embrionarias. Tenga en cuenta que el factor de transcripción Oct4 tiene un papel en la regulación de la transcripción del gen Oct4.

FUENTE: Tomado de Ng Huck-Hui y MA Surani. *Nature Cell Biology* 2011;13:490. *Nature Cell Biology* by Nature Publishing Group. Reproducido con el permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

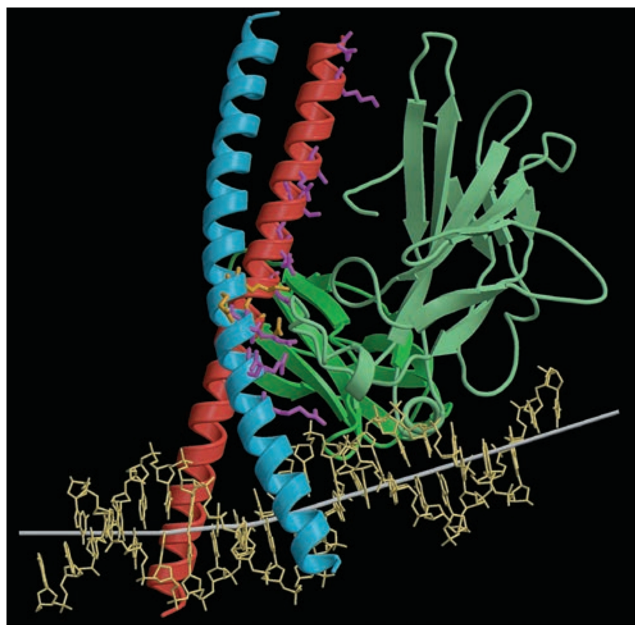


**FIGURA 12-38 Interacciones entre factores de transcripción unidos a diferentes sitios en la región reguladora de un gen.** Esta imagen muestra la estructura terciaria de dos factores de transcripción separados, NFAT-1 (verde) y AP-1 (cuyas dos subunidades se muestran en rojo y azul) unidos al DNA en corriente arriba de un gen de citocina involucrado en la respuesta inmune. La interacción cooperativa entre estas dos proteínas altera la expresión del gen de la citocina. La barra gris traza el camino de la hélice del DNA, que se dobla como resultado de esta interacción proteína-proteína.

FUENTE: Tom K Kerppola. *Estructura* 1998;6:550, con permiso de Elsevier.

patrones de expresión genética entre células de tipo, tejido, etapa de desarrollo y estados fisiológicos diferentes.

El fenotipo de una célula diferenciada, como un fibroblasto o una célula epitelial, es, en general, bastante estable. Sin embargo, estas células pueden ser inducidas a adoptar nuevos fenotipos, si se ven obligadas a expresar ciertos genes que no es usual que expresen. Se demostró a fines de la década de 1980, por ejemplo, que era posible inducir a los fibroblastos del tejido conjuntivo a convertirse en células musculares, al obligar a las células a expresar un único factor de transcripción específico del tejido, MyoD (que se muestra en la figura 12-42*a*). Como resultado de este y otros experimentos, MyoD se hizo conocido como un "factor regulador maestro", que desempeña un papel clave en la dirección de la diferenciación del tejido muscular en los embriones en desarrollo. Otro ejemplo del "poder" de los factores de transcripción en la determinación del fenotipo de una célula se muestra en la **FIGURA 12-39**, que expone el resultado espectacular de un experimento, en el que un gen de la mosca de la fruta llamado *"sin ojos"* se ha expresado en células que normalmente no expresarían este gen. En este caso, células de la pata en desarrollo. La expresión de *sin ojos* activa una vía de desarrollo que conduce a la formación de un ojo situado en una ubicación muy inusual del cuerpo. Al igual que MyoD en el desarrollo muscular de los vertebrados, el factor de transcripción *sin ojos* puede considerarse como un factor regulador principal en el desarrollo de los ojos en estos insectos.

Los experimentos más impresionantes para probar el poder de los factores de transcripción en la dirección de las transformaciones fenotípicas se han centrado en las células madre embrionarias (ES). Como se discutió en Perspectiva humana del capítulo 1 (sección 1.6), las células madre embrionarias (ES) aparecen muy temprano en el desarrollo de un embrión de mamífero y exhiben dos propiedades clave: son 1) capaces de autorrenovación indefinida y 2) son pluripotentes, es decir, capaces de diferenciarse en todos los distintos tipos de células en el cuerpo. Se sabía, desde hace varios años, que estas células madre pluripotentes tenían un conjunto particular de factores de transcripción que desempeñaban un papel importante en el mantenimiento de su autorrenovación y estado pluripotente. La importancia de estos factores de transcripción en la biología de las células ES fue demostrada por Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi, en el 2006, cuando introdujeron los genes de 24 factores de transcripción distintos en fibroblastos adultos de ratón. Más tarde, encontraron que la introducción de una combinación de genes que codificaban sólo cuatro factores de transcripción específicos (4Oct, Sox2, Myc y Klf4) era suficiente para reprogramar los fibroblastos diferenciados, convirtiéndolos en células indiferenciadas que se comportaban como células ES pluripotentes. El proceso de reprogramación celular no ocurre dentro de una generación de células individuales, sino de manera gradual, mientras las células se dividen en cultivo. A medida que las células se reprograman, los cuatro genes introducidos se silencian, mientras se activan los genes endógenos de las células que gobiernan la pluripotencia. La reprogramación va acompañada de una reorganización de la cromatina, de tal manera que, en su mayor parte, las marcas epigenéticas (modificaciones de histonas y patrones de metilación de DNA) de la célula diferenciada se "borran" y se instalan las marcas epigenéticas características de una célula ES.[6] Como se discutió en la sección 1.6, las células pluripotentes inducidas, o *células iPS,* como se les llama, son capaces de dividirse indefinidamente en cultivo y de diferenciarse en todos los diversos tipos de células del cuerpo. Cada vía de diferenciación, ya sea que conduzca a la formación de una neurona, un fibroblasto o una célula muscular, va acompañada de cambios en las marcas epigenéticas que caracterizan a la cromatina de las células a lo largo de esa vía. Estos cambios epigenéticos tienen el efecto de restringir el potencial de desarrollo de las células a lo largo de cada vía, lo que las hace menos capaces de desarrollarse en otros tipos de células.




**FIGURA 12-39 Conversión fenotípica inducida por la expresión anormal de un único factor de transcripción.** La pata de esta mosca de la fruta tiene un ojo completamente formado, que se desarrolló como resultado de la expresión forzada del gen sin ojos dentro de las células del primordio de la pata, durante el desarrollo de este insecto.

FUENTE: Cortesía de Walter Gehring, Universidad de Basilea.

**REPASO**

1. ¿En qué difieren los activadores y represores transcripcionales en términos de su efecto sobre la expresión genética?

## 12.12 Estructura de los factores de transcripción

La estructura tridimensional de numerosos complejos DNA-proteína ha sido determinada por cristalografía de rayos X y espectroscopía de NMR, proporcionando un retrato básico de la forma en que estas dos macromoléculas interactúan entre sí. Al igual que la mayoría de las proteínas, los factores de transcripción contienen diferentes dominios que median en diferentes aspectos de la función de la proteína. Los factores de transcripción normalmente contienen, al menos, dos dominios: un *dominio de unión a DNA*, que se une a una secuencia específica de pares de bases en el DNA, y un *dominio de activación*, que regula la transcripción al interactuar con otras proteínas. Además, muchos factores de transcripción contienen una superficie que promueve la unión de la proteína con otra proteína de estructura idéntica o similar para formar un dímero (**FIGURA 12-40**). La formación de dímeros ha demostrado ser una característica común de muchos tipos diferentes de factores de transcripción y desempeña un papel importante en la regulación de la expresión genética.

Los dominios de unión a DNA de la mayoría de los factores de transcripción se pueden agrupar en varias clases generales, cuyos miembros poseen estructuras relacionadas (*motivos*) que interactúan con secuencias de DNA. La existencia de varias familias de proteínas de unión a DNA indica que la evolución ha encontrado una serie de soluciones diferentes al problema de la construcción de polipéptidos que pueden unirse a la doble hélice del DNA. Como se verá en breve, la mayoría de estos motivos

[6] Esta afirmación está calificada con las palabras "en su mayor parte", porque estudios recientes indican que el proceso de reprogramación no está completo. En cambio, las células iPS conservan algunas de las marcas epigenéticas de las células diferenciadas de las que se derivan, lo que indica que no son realmente equivalentes a las células madre embrionarias.

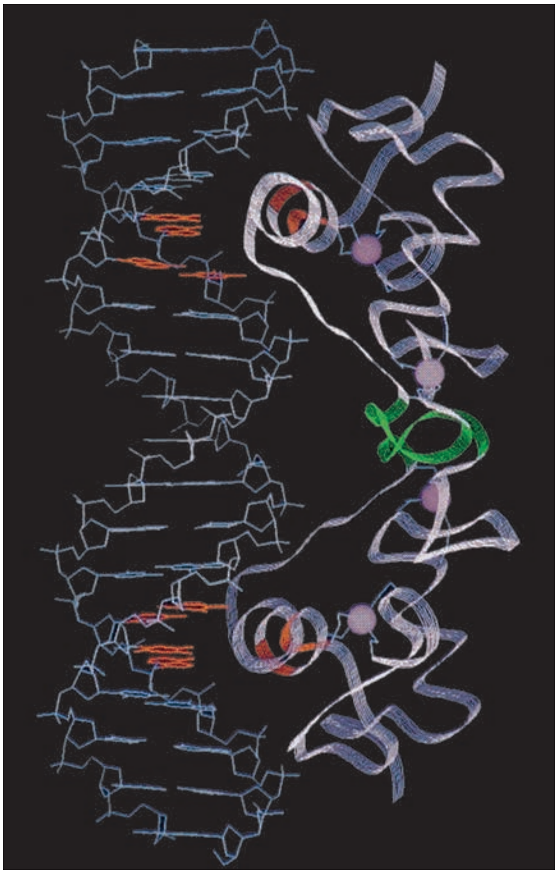


**FIGURA 12-40 Interacción entre un factor de transcripción y su secuencia blanco de DNA.** Un modelo de la interacción entre los dos dominios de unión al DNA del receptor dimérico de glucocorticoides (GR, *glucocorticoid receptor*) y el DNA blanco. Dos hélices α, una de cada subunidad del dímero, se extienden simétricamente en dos surcos principales adyacentes del DNA blanco. Los residuos en el GR dimérico que son importantes para las interacciones entre los dos monómeros son de color verde. Los cuatro iones de zinc (dos por monómero) se muestran como esferas moradas.

FUENTE: Tomado de T Hard, *et al.* Cortesía de Robert Kaptein. *Science* 1990;249:159; © 1990, reimpreso con permiso de AAAS.

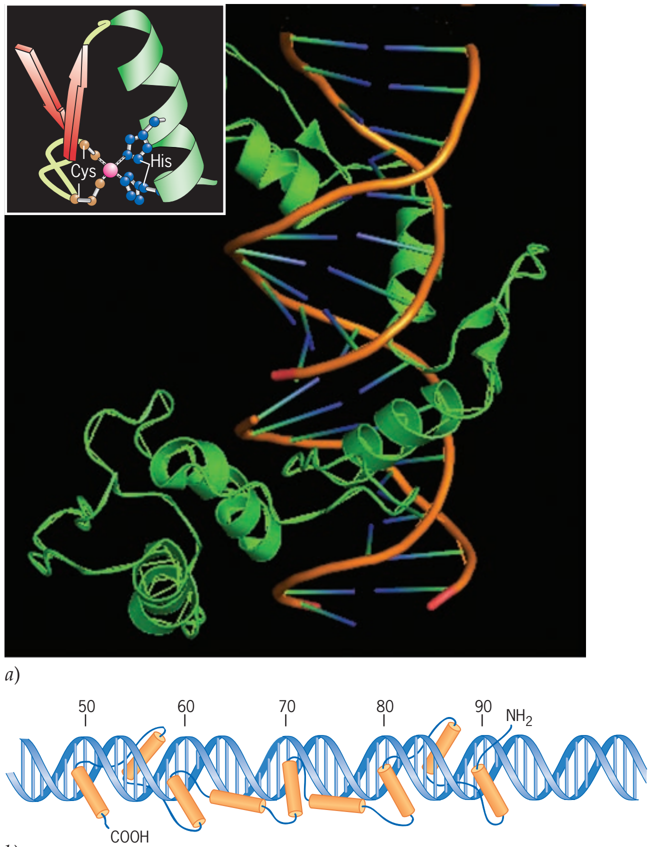



**FIGURA 12-41 Factores de transcripción del dedo de zinc.** *a*) Estructura cristalina del complejo entre una proteína con cinco dedos de zinc (llamada 2GLI) y el DNA. La cadena de proteína se muestra en verde; la hélice de DNA es naranja y azul. El recuadro muestra la estructura de un único dedo de zinc. *b*) Modelo de TFIIIA unido al DNA del gen de RNA 5S. Se requiere TFIIIA para la transcripción del gen de rRNA 5S por la RNA polimerasa III.

FUENTE: *a*) Esta obra está autorizada bajo la licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0. *b*) Tomado de NP Pavietich y CO Pabo. *Science* 1993;261:1702, reimpreso con permiso de AAAS.

contiene un segmento (a menudo una hélice α, como en la figura 12-40) que se inserta en el surco principal del DNA, donde reconoce la secuencia de pares de bases que recubren el surco. La unión de la proteína al DNA se lleva a cabo mediante una combinación específica de fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos y enlaces de hidrógeno entre residuos de aminoácidos y diversas partes del DNA, incluida la cadena principal.

Entre los motivos más comunes que se presentan en las proteínas eucariotas unidas al DNA están el dedo de zinc, la hélice-asa-hélice y la cremallera de leucina. Cada uno proporciona un trabajo de armazón estructuralmente estable, en el que las superficies específicas de DNA de reconocimiento de la proteína pueden posicionarse de manera adecuada para interactuar con la doble hélice.

## El motivo dedo de zinc

La clase más grande de factores de transcripción de mamíferos contiene un motivo llamado *dedo de zinc*. En la mayoría de los casos, un ion de zinc de cada dedo se coordina entre dos cisteínas y dos histidinas. Los dos residuos de cisteína son parte de una lámina β de dos cadenas en un lado del dedo, y los dos restos de histidina forman parte de una hélice α corta en el lado opuesto del dedo (recuadro, **FIGURA 12-41*a***). Estas proteínas normalmente tienen una serie de dedos de este tipo, que actúan independientemente unos de otros y están separados para proyectarse en sucesivos surcos principales en el DNA blanco, como se ilustra en la figura 12-41*a*). La primera proteína dedo de zinc que se descubrió, TFIIIA, tiene nueve dedos de zinc (figura 12-41*b*). Otros factores de transcripción del dedo de zinc incluyen Egr, que participa en la activación de los genes necesarios para la división celular, y la familia de factores de transcripción GATA, que está involucrada en múltiples eventos de desarrollo, incluido el del músculo cardiaco. La comparación de varias proteínas con dedos de zinc indica que el motivo proporciona el marco estructural para una amplia variedad de secuencias de aminoácidos que reconocen un conjunto diverso de secuencias de DNA. De hecho, los investigadores están intentando diseñar nuevas especies de proteínas de dedos de zinc que sean capaces de dirigir las secuencias de DNA que gobiernan la expresión de determinados genes de interés. Se espera que tales proteínas tengan el potencial de actuar como fármacos terapéuticos activando o desactivando la expresión de genes relacionados con la enfermedad.

## El motivo hélice-asa-hélice (HLH, *helix-loop-helix*)

Como su nombre lo indica, este motivo se caracteriza por dos segmentos helicoidales α separados por un asa intermedia. El dominio HLH a menudo está precedido por un tramo de aminoácidos altamente básicos, cuyas cadenas laterales cargadas positivamente entran en contacto con el DNA y determinan la especificidad de secuencia del factor de transcripción. Las proteínas con este moti-

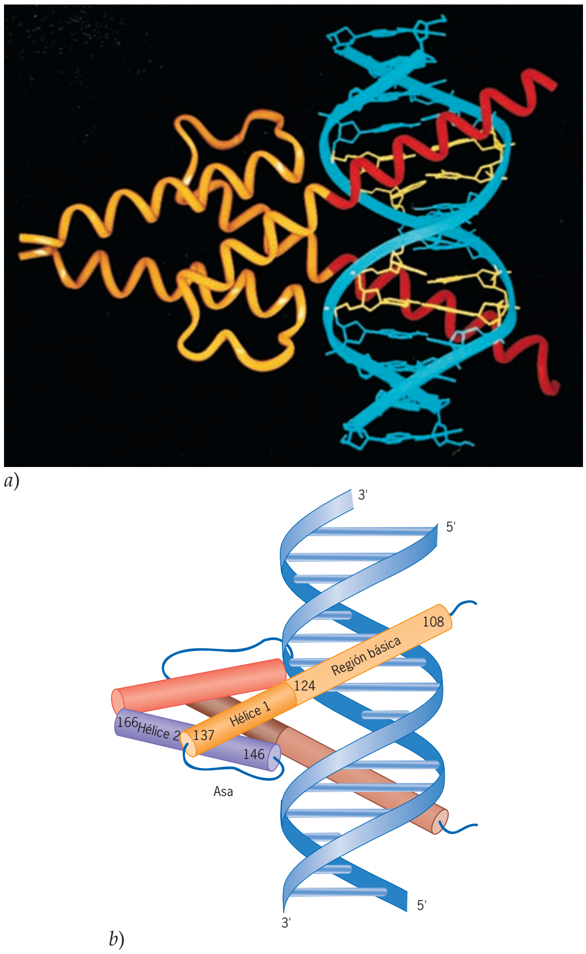



**FIGURA 12-42 Factores de transcripción básicos de hélice-asa-hélice (bHLH).** *a*) MyoD, un factor de transcripción dimérico implicado en desencadenar la diferenciación de células musculares, es una proteína bHLH que se une al DNA mediante una región básica asociada. La región básica de cada monómero MyoD es roja, mientras que la región hélice-asa-hélice de cada monómero MyoD se muestra en marrón. Las bases de DNA unidas por el factor de transcripción se indican en amarillo. *b*) Esquema del complejo dimérico MyoD en la misma orientación que en la parte a. Las hélices se representan como cilindros.

FUENTE: *a*) Tomado de: Philip CM, *et al*. Cortesía de Carl O Pabo. *Cell* 1994;77:453; *Cell* by Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

vo básico HLH (o bHLH, *basic-HLH*) siempre aparecen como dímeros, como se ilustra en el ejemplo del factor de transcripción MyoD en la **FIGURA 12-42**. Las dos subunidades del dímero por lo general están codificadas por genes diferentes, lo que hace que la proteína sea un heterodímero.

La heterodimerización expande en gran medida la diversidad de factores reguladores que pueden generarse a partir de un número limitado de polipéptidos (**FIGURA 12-43**). Supongamos, por ejemplo, que una célula debe sintetizar cinco polipéptidos diferentes que contienen bHLH que son capaces de formar heterodímeros entre sí en cualquier combinación, entonces se podrían formar 32 ($2^5$) diferentes factores de transcripción que reconocen 32 secuencias de DNA diferentes. En realidad, las combinaciones entre polipéptidos están restringidas, no a diferencia de la formación de moléculas de integrina heterodiméricas (p. 232).

Los factores de transcripción que contienen HLH desempeñan un papel clave en la diferenciación de ciertos tipos de tejidos, incluido el músculo esquelético (como se ilustra en la figura 12-34). Los factores de transcripción que contienen HLH también participan en el control de la proliferación celular y se han visto implicados en la formación de ciertos cánceres. En la página 479, se señaló que las translocaciones cromosómicas pueden generar genes anormales, cuya expresión hace que la célula se vuelva cancerosa. Se han encontrado genes que codifican, al menos, cuatro proteínas bHLH diferentes (MYC, SCL, LYL-1 y E2A) en translocaciones cromosómicas que conducen al desarrollo de cánceres específicos. El más frecuente de estos cánceres es el linfoma de Burkitt, en el cual el gen *MYC* en el cromosoma 8 se transloca a un *locus* en el cromosoma 14 que contiene un sitio regulador para un gen que codifica parte de una molécula de anticuerpo. Se piensa que la sobreexpresión del gen *MYC* en su nueva ubicación es un factor importante en el desarrollo de este linfoma.

## El motivo de cremallera de leucina

Este motivo recibe su nombre del hecho de que las leucinas se producen cada séptimo aminoácido a lo largo de un tramo de hélice α. Como una hélice α se repite cada 3.5 residuos, todas las leucinas a lo largo de este tramo de polipéptido se enfrentan en la misma dirección. Dos hélices α de este tipo son capaces de juntarse para formar una *espiral enrollada*. Por tanto, como la mayoría de los otros factores de transcripción, las proteínas con un motivo de cremallera de leucina existen como dímeros. El motivo de cremallera de leucina puede unirse al DNA, porque contiene un tramo de aminoácidos básicos en un lado de la hélice α que contiene leucina. Juntos, el segmento básico y la cremallera de leucina, se conocen como motivo *bZIP*. Por tanto, al igual que las proteínas bHLH, las porciones helicoidales α de las proteínas bZIP son importantes en la dimerización, mientras que el tramo de aminoácidos básicos permite que la proteína reconozca una secuencia de nucleótidos específica en el DNA. AP-1, cuya estructura e interacción con el DNA se muestran en la figura 12-38, es un ejemplo de un factor de transcripción bZIP. AP-1 es un heterodímero cuyas dos subunidades (fos y jun, que se muestran en rojo y azul en la figura 12-38, respectivamente) están codificadas por los genes *FOS* y *JUN*. Ambos genes desempeñan un papel importante en la proliferación celular y, cuando mutan, pueden contribuir a que una célula se vuelva maligna. Las mutaciones en cualquiera de estos genes que evitan que las proteínas formen heterodímeros, también evitan que las proteínas se unan al DNA, lo que indica la importancia de la formación de dímeros para regular su actividad como factores de transcripción.

### REPASO

1. ¿Cuáles son algunas de las propiedades estructurales que tienden a encontrarse en varios grupos de factores de transcripción?

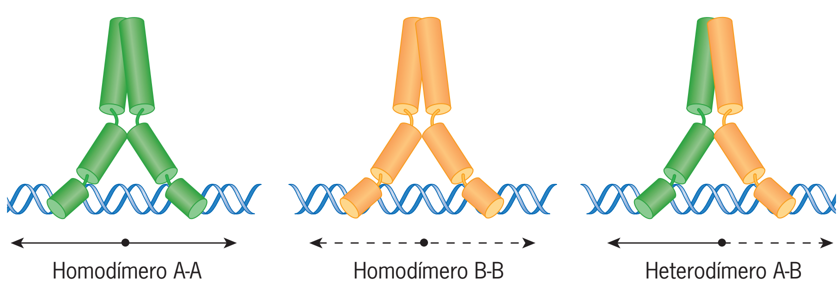



**FIGURA 12-43 Modificación de las especificidades de unión a DNA de los factores de transcripción a través de la dimerización.** En este modelo de proteína bHLH, se pueden formar tres factores de transcripción diméricos diferentes que reconocen diferentes sitios de unión al DNA cuando las dos subunidades se asocian en diferentes combinaciones. El genoma humano codifica aproximadamente 118 monómeros diferentes de bHLH, que podrían generar miles de diferentes factores de transcripción diméricos.

## 12.13 Sitios de DNA implicados en la regulación de la transcripción

La complejidad inherente en el control de la transcripción genética se puede ilustrar mediante el examen del DNA en y alrededor de un solo gen. La siguiente discusión se enfoca en el gen que codifica la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*). PEPCK es una de las enzimas clave de la gluconeogénesis, la vía metabólica que convierte el piruvato en glucosa (véase figura 3-31). La enzima se sintetiza en el hígado cuando los niveles de glucosa son bajos, como podría ocurrir, por ejemplo, cuando ha pasado un periodo considerable desde la última comida. Por el contrario, la síntesis de la enzima cae bruscamente después de la ingestión de una comida rica en carbohidratos, como la pasta. El nivel de síntesis de mRNA PEPCK está controlado por una variedad de diferentes factores de transcripción (**FIGURA 12-44**), que incluyen varios receptores de hormonas que intervienen en la regulación del metabolismo de los carbohidratos. Las claves para entender la regulación de la expresión del gen *PEPCK* se encuentran en 1) desentrañar las funciones de las numerosas secuencias reguladoras de DNA que residen corriente arriba del propio gen, 2) identificar los factores de transcripción que unen estas secuencias y 3) dilucidar las vías de señalización que activan la maquinaria responsable de la expresión genética selectiva (discutido en el capítulo 15).

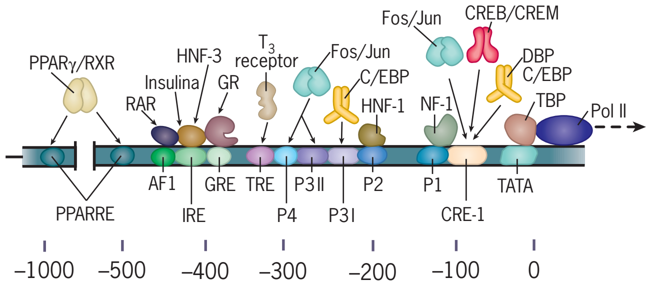



**FIGURA 12-44 Regulación de la transcripción del gen PEPCK de rata.** La transcripción de este gen, como la de otros, está controlada por una combinación de factores de transcripción que interactúan con secuencias de DNA específicas localizadas en una región reguladora situada corriente arriba de la región codificante del gen. Dentro de esta región se incluye un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE, *glucocorticoid response element*) que, cuando se une a un receptor de glucocorticoides, estimula la transcripción del promotor. También se incluyen dentro de la región reguladora sitios de unión para un receptor de hormona tiroidea (TRE marcado, *thyroid hormone receptor*), una proteína que se une a AMP cíclico, que se produce en respuesta a la hormona glucagón (CRE-1 marcada); y la hormona insulina (IRE marcada). También se observa que varios otros factores de transcripción se unen a sitios reguladores en esta región corriente arriba del gen PEPCK.

FUENTE: Tomado de SE Nizielski, *et al. J Nutrition* 1996;126:2699; © American Society for Nutritional Sciences.

La secuencia reguladora más cercana (más proximal) corriente arriba del gen *PEPCK* es la caja TATA, que es un elemento principal del *promotor* del gen (**FIGURA 12-45**). Como se analizó en la página 408, un promotor es una región corriente arriba de un gen que regula el inicio de la transcripción. Para los propósitos de este texto, se dividirá el promotor eucariota en regiones separadas, que no están tan delineadas. La región que se extiende desde, aproximadamente, la caja TATA hasta el sitio de inicio de la transcripción se designa como el *promotor nuclear*. El promotor nuclear es el sitio de ensamblaje de un complejo de preiniciación que consiste en RNA polimerasa II y una serie de factores de transcripción generales (GTF, *general transcription factors*) que se requieren antes de que se pueda transcribir un gen eucariota. Los elementos del promotor nuclear y los GTF que se unen a ellos (que se muestran en la figura 11-18) definen el sitio exacto en el que se comenzará la transcripción (el sitio +1).

La caja TATA no es la única secuencia corta que comparten grandes cantidades de genes. Otras dos secuencias, llamadas caja CAAT y caja GC, que se ubican más arriba del gen, a menudo se

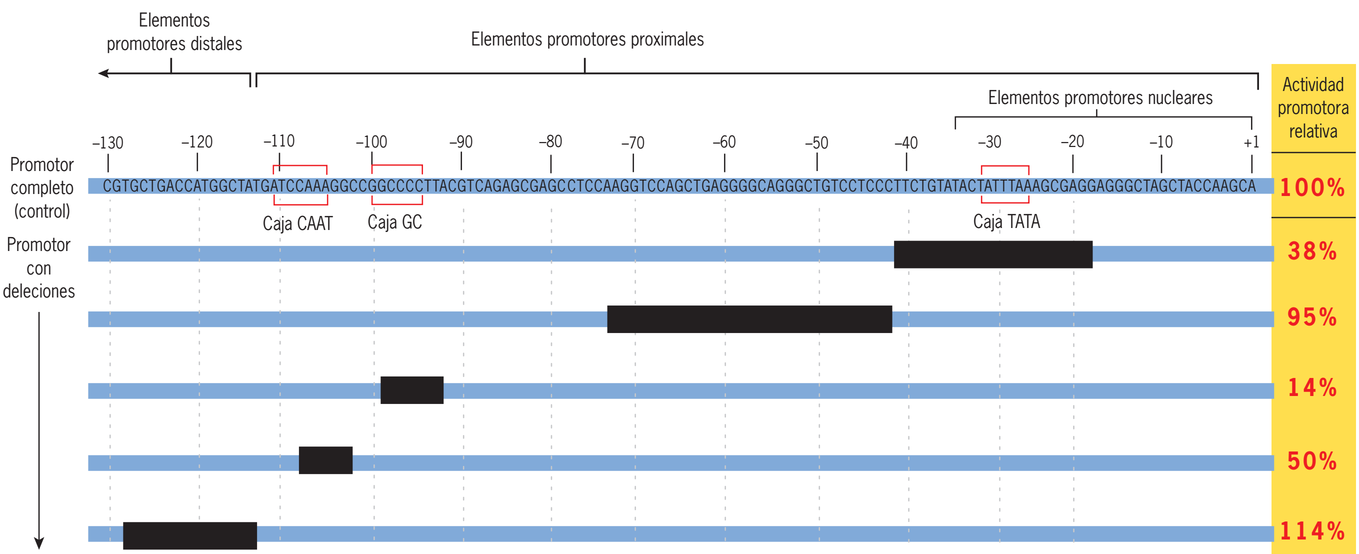



**FIGURA 12-45 Identificación de secuencias promotoras requeridas para la transcripción.** La línea superior muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena del promotor del gen PEPCK. Se indican las cajas TATA, CAAT y GC. Las otras cinco líneas muestran los resultados de experimentos en los que se eliminaron regiones particulares del promotor (indicadas por recuadros negros). El nivel de transcripción observado del gen PEPCK en cada uno de estos casos se indica a la derecha. Las eliminaciones que exterminan la totalidad o parte de las tres cajas causan una marcada disminución en el nivel de transcripción, mientras que las eliminaciones que afectan a otras regiones tienen consecuencias menores o ninguna. (Como se señaló en el capítulo 11, muchos promotores de mamíferos carecen de la caja TATA. Los promotores que carecen de la caja TATA a menudo tienen un elemento conservado en una posición corriente abajo del sitio inicial, llamado elemento promotor corriente abajo, o DPE, *downstream promoter element*.)

FUENTE: Datos tomados de estudios de Richard W Hanson y Daryl K Granner y sus colegas.

requieren para que la RNA polimerasa II inicie la transcripción. Las cajas CAAT y GC se unen a los factores de transcripción (p. ej., NF1 y SP1) que se encuentran en muchos tejidos y se emplean ampliamente en la expresión genética. Mientras que la caja TATA determina el sitio de inicio de la transcripción, las cajas CAAT y GC son dos de las muchas secuencias que regulan la frecuencia con la que la RNA polimerasa II inicia la transcripción. La caja TATA está dentro del promotor nuclear, por lo general dentro de 25-30 bases del sitio de inicio de la transcripción. Las cajas CAAT y GC, cuando están presentes, se localizan normalmente dentro de 100-150 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, una región denominada *región promotora proximal*, como se indica en la línea superior de la figura 12-45.

Cuantos más genes se examinan, más variabilidad se encuentra en la naturaleza y ubicación de los elementos promotores que regulan la expresión genética. Además, un número significativo de genes de mamíferos (es posible que tantos como 50% de ellos) tiene más de un promotor (es decir, *promotores alternativos*) que permite que se inicie la transcripción en más de un sitio corriente arriba de un gen. Es típico que los promotores alternativos estén separados unos de otros por varios cientos de bases, de modo que los transcriptores primarios producidos por su uso diferencial se distinguirán considerablemente en sus extremos 5′. En algunos casos, se utilizan promotores alternativos en diferentes tejidos, pero conducen a la síntesis del mismo polipéptido. En tales casos, es probable que los mRNA que codifican las proteínas tengan diferentes UTR en 5′, lo que los somete a distintos tipos de control de nivel de traducción. En otros casos, los promotores alternativos promueven la síntesis de proteínas relacionadas que difieren en su secuencia de aminoácidos *N*-terminal. En varios casos, los promotores alternativos rigen la transcripción de los mRNA que se traducen en diferentes marcos de lectura (p. 442) para producir polipéptidos completamente diferentes.

¿Cómo aprenden los investigadores qué sitios en el genoma interactúan con un factor de transcripción particular? Las siguientes estrategias generales se emplean con frecuencia para hacer esta determinación.

- **Mapeo de deleción.** En este procedimiento, se preparan moléculas de DNA que contienen deleciones de varias partes del promotor del gen (figura 12-45). Los DNA alterados se introducen entonces en las células y se mide la capacidad de los mutantes de deleción para iniciar la transcripción. En muchos casos, la deleción de algunos nucleótidos tiene poco o ningún efecto en la transcripción de un gen adyacente. Sin embargo, si la deleción cae dentro de una región que evita la unión de los factores de transcripción que activan la transcripción, el nivel de transcripción disminuirá (como en las líneas 2, 4 y 5 de la figura 12-45). La deleción de otras regiones podría aumentar la transcripción, lo que indicaría que un factor de transcripción se une a esta región que inhibe la misma, en otras palabras, un represor de la transcripción. Por último, la deleción de otras regiones podría tener poco o ningún efecto (líneas 3 y 6 de la figura 12-45).
- **Huella de DNA.** Cuando un factor de transcripción se une a una secuencia de DNA, la presencia de la proteína protege la secuencia de DNA de la digestión por nucleasas. Los investigadores aprovechan esta propiedad aislando la cromatina de las células y tratándola con enzimas que digieren el DNA, como la DNasa I. Las regiones que no están protegidas por proteínas se digieren, mientras que aquellas que tienen proteínas unidas están protegidas. Una vez que se ha digerido la cromatina, se elimina la proteína unida y se identifican las secuencias de DNA protegidas.
- **Análisis de localización del genoma completo.** Como su nombre lo indica, esta estrategia permite a los investigadores monitorear de manera simultánea todos los sitios dentro del genoma que están unidos por un factor de transcripción dado bajo un determinado conjunto de condiciones fisiológicas. Un resumen del enfoque se muestra en la **FIGURA 12-46**. Para llevar a cabo este análisis, las células se cultivan en las condiciones deseadas o se aíslan de un tejido particular o etapa de desarrollo, y luego se tratan con un agente, como el formaldehído, que destruirá las células y entrecruzará los factores de transcripción a los sitios de DNA en que estaban vinculados

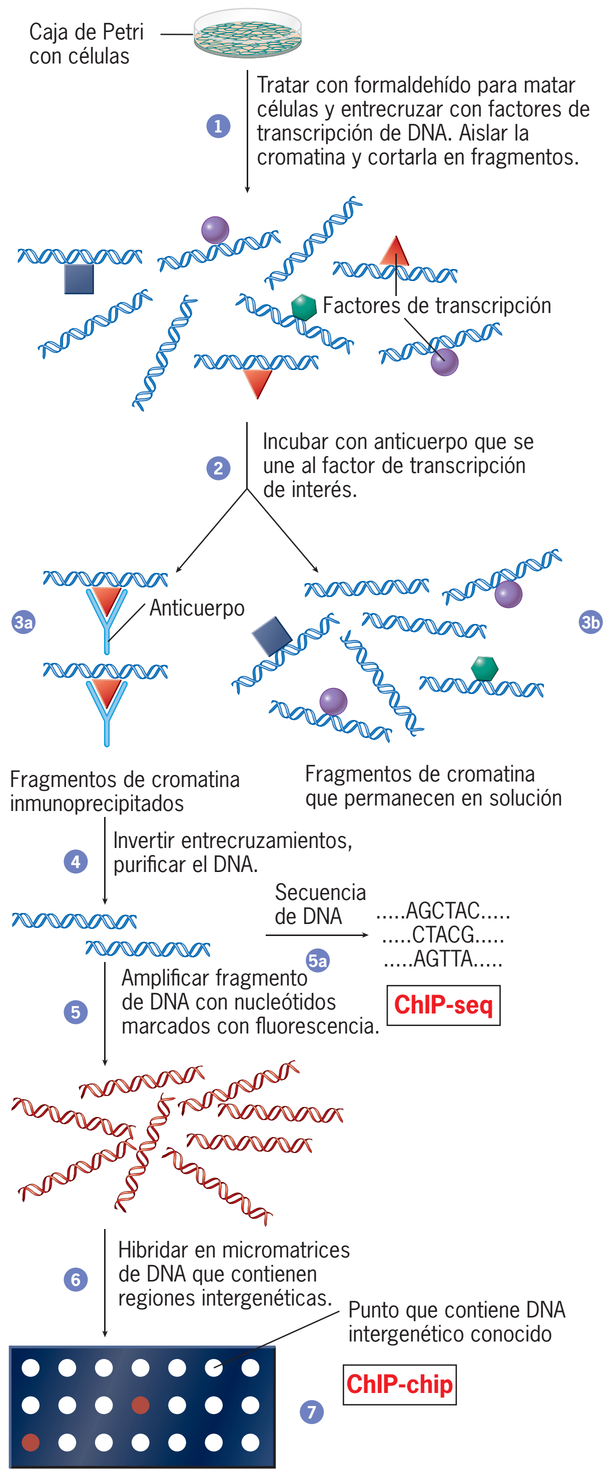



**FIGURA 12-46** Uso de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para identificar sitios de unión a factor de transcripción a escala global. Los pasos se describen en el texto.

en la célula viva (paso 1, figura 12-46). Después del paso de entrecruzamiento, la cromatina se aísla, se corta en fragmentos pequeños y se incuba con un anticuerpo que se une al factor de transcripción de interés (paso 2). La unión del anticuerpo conduce a la precipitación de fragmentos de cromatina que contienen el factor de transcripción unido (paso 3*a*), mientras se dejan todos los fragmentos de cromatina no unidos en solución (paso 3*b*). Una vez que se ha llevado a cabo este proceso de *inmunoprecipitación de la cromatina* (o ChIP, *chromatin immunoprecipitation*), los enlaces cruzados entre la proteína y el DNA en el precipitado se pueden revertir y los segmentos de DNA se pueden purificar (paso 4). El siguiente paso es identificar dónde en el genoma se encuentran estos sitios de unión del factor de transcripción. Se pueden tomar dos enfoques diferentes para hacer esta determinación: el DNA purificado se marca con fluorescencia y se usa en micromatrices (pasos 5-7), en una técnica llamada *ChIP-chip*, o el DNA purificado se puede secuenciar de forma directa usando enfoques de secuenciación masivamente paralelos (paso 5*a*), en una técnica llamada *ChIP-seq*. A diferencia de la micromatriz mostrada en la figura 12-35, que contiene sondas de DNA que representan genes codificantes de proteínas, las micromatrices utilizadas en estos experimentos de chip-ChIP contienen sondas de DNA de todo el genoma. Ya sea por micromatrices o por secuenciación directa, los experimentos permiten la identificación de sitios de unión específicos en todo el genoma para cualquier factor de interés.

Curiosamente, cuando estos tipos de experimentos se realizan con factores de transcripción de mamíferos, un porcentaje significativo de los sitios de unión a DNA se encuentra a distancias considerables de los promotores de genes conocidos. Se especula que algunos de estos sitios están involucrados en la regulación de la transcripción de RNA no codificantes, como los microRNA discutidos en la página 434. También es probable que muchos de los miles de *loci* genéticos identificados en esta pantalla de genoma completo tengan poco o ninguna importancia real en la regulación de la expresión genética. Una forma de evaluar el posible significado de la unión de un factor de transcripción es considerar los datos en un contexto más amplio. Por ejemplo, varios factores de transcripción, como Oct4, Sox2 y Nanog, son importantes para mantener el estado pluripotente de las células madre embrionarias (p. 18). Cuando se analizan solos, cada uno de estos tres factores de transcripción se une a varios miles de sitios dentro del genoma de las células madre embrionarias. Por el contrario, sólo una pequeña fracción de estas regiones genómicas recolectadas está ligada a estos tres factores clave de transcripción. La presencia de los tres factores de transcripción unidos estrechamente entre sí proporciona una confianza mucho mayor en que una región dada es importante, desde el punto de vista de la función, en la regulación de la expresión genética en estas células. Además de estudiar los factores de transcripción, la técnica ChIP se puede modificar para localizar las posiciones dentro del genoma de cualquier otro tipo de proteína unida al DNA, como un tipo particular de histona modificada o incluso las ubicaciones de moléculas de RNA polimerasa unidas.

### REPASO

1. ¿Qué tipos de secuencias reguladoras se encuentran en las regiones reguladoras de DNA corriente arriba de un gen, como el que codifica para PEPCK? ¿Cuál es el papel de estas diversas secuencias en el control de la expresión del gen(es) cercano(s)?

## 12.14 Ejemplo de activación transcripcional: el receptor de glucocorticoides

Puede decirse que la transcripción está controlada por un código combinatorio que consiste en una matriz de factores de transcripción y cambios en sus sitios de unión preferidos de gen a gen. Los sitios en los que estos factores de transcripción se unen a la región que flanquea un gen, a menudo se denominan *elementos de respuesta*. Aquí, el centro de atención está en los glucocorticoides, un grupo de hormonas esteroideas (p. ej., cortisol) sintetizadas por la glándula suprarrenal. Los análogos de estas hormonas, como la prednisolona, se prescriben como potentes agentes antiinflamatorios.

La secreción de glucocorticoides es más alta durante los periodos de estrés, como ocurre durante la inanición o después de una lesión física grave. Para que una célula responda a los glucocorticoides, debe poseer un receptor específico capaz de unirse a la hormona. El *receptor de glucocorticoides* (GR) es un miembro de una superfamilia de receptores nucleares (incluidos los receptores de la hormona tiroidea, el ácido retinoico y el estrógeno) que se cree que han evolucionado a partir de una proteína ancestral común. Los miembros de esta superfamilia son más que simples receptores de hormonas, también son factores de transcripción vinculantes de DNA. Cuando una hormona glucocorticoide entra en una célula blanco, se une a una proteína receptora de glucocorticoides en el citosol, cambiando la conformación de la proteína. Este cambio expone una señal de localización nuclear (p. 462), que facilita la translocación del receptor al núcleo (**FIGURA 12-47**). El receptor unido al ligando se une a una secuencia de DNA específica, llamada *elemento de respuesta glucocorticoide (GRE, glucocorticoid response element).* Para el gen PEPCK, este sitio se localiza corriente arriba del promotor nuclear (figura 12-44), y el enlace activa la transcripción del gen (figura 12-47). Secuencias GRE idénticas o similares se encuentran corriente arriba de una serie de otros genes en diferentes cromosomas. Si el sitio es el sitio de unión preferido exacto, el gen responderá en alto grado a niveles elevados de glucocorticoides, mientras que los genes con sitios de unión imperfecta responderán de acuerdo con el cambio en la afinidad de unión por el complejo receptor de glucocorticoides. En consecuencia, un estímulo único (concentración elevada de glucocorticoides) puede activar de manera simultánea una cantidad de genes, cada uno en su propio nivel preciso, lo que permite una respuesta completa y finamente ajustada que satisfaga las necesidades de la célula.

El elemento preferido de respuesta a glucocorticoides consiste en la siguiente secuencia:

5′-AGAACAnnnTGTTCT-3′
3′-TCTTGTnnnACAAGA-5′

donde n puede ser cualquier nucleótido. Una secuencia simétrica de este tipo se llama *palíndromo,* porque las dos cadenas tienen la misma secuencia de 5′ a 3′. Se ve que el GRE consiste en dos tramos definidos de nucleótidos separados por tres nucleótidos indefinidos. La doble naturaleza de un GRE es importante, porque los pares de polipéptidos GR se unen al DNA como dímeros, en los que cada subunidad del dímero se une a una mitad de la secuencia de DNA indicada anteriormente (véase figura 12-40). La importancia del GRE en la mediación de una respuesta hormonal se demuestra de una forma más clara al introducir una de estas secuencias en la región corriente arriba de un gen que normalmente no responde a los glucocorticoides. Cuando las células que contienen DNA que se ha diseñado de esta manera se exponen a los glucocorticoides, se inicia la transcripción del gen corriente abajo del GRE trasplantado. La evidencia visual de que la transcripción genética puede ser estimulada por regiones reguladoras extranjeras se presenta en la figura 18-48.

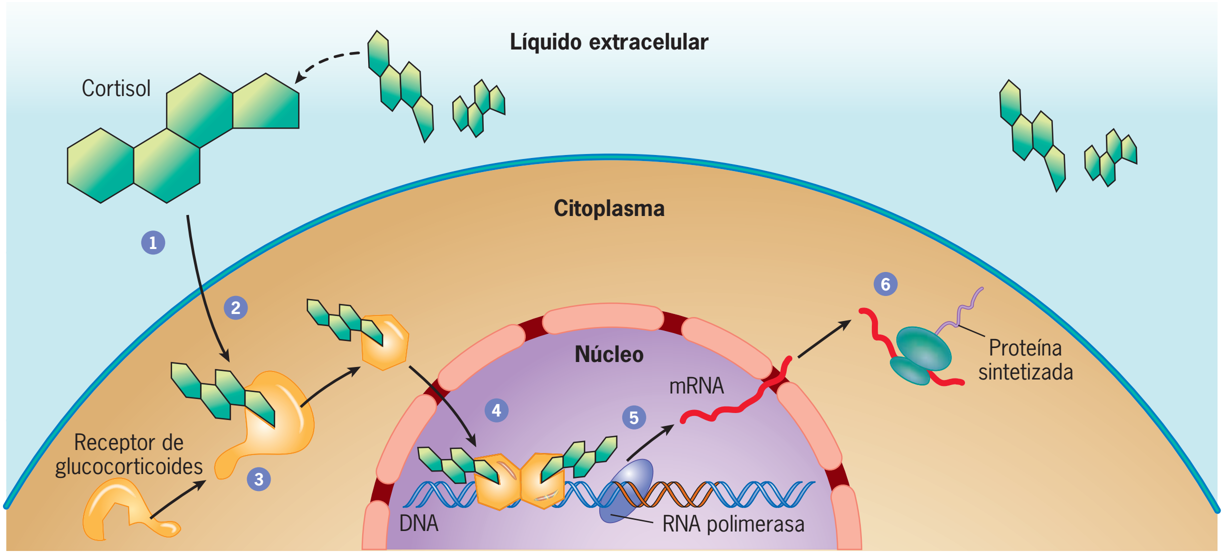



**FIGURA 12-47 Activación de un gen por una hormona esteroidea.** La hormona cortisol, un glucocorticoide, ingresa a la célula desde el líquido extracelular (paso 1), se difunde a través de la bicapa lipídica (paso 2) y al citoplasma, donde se une a un receptor de glucocorticoides (paso 3), cambiando su conformación y causando que se transloque al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción y se une a un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) del DNA (paso 4). El receptor de glucocorticoides se une al GRE como un dímero, que activa la transcripción del DNA (paso 5), lo que conduce a la síntesis de proteínas específicas en el citoplasma (paso 6).

**REPASO**

1. ¿En qué se asemejan las funciones de un represor lac bacteriano y un receptor de glucocorticoides de mamíferos? ¿En qué se diferencian?

## 12.15 Activación transcripcional: el papel de los potenciadores, promotores y coactivadores

El GRE situado corriente arriba del gen PEPCK y los otros elementos de respuesta ilustrados en la figura 12-44 se denominan *elementos promotores distales,* para distinguirlos de los elementos promotores proximales situados más cerca del gen o del promotor nuclear que determina el sitio de iniciación (figura 12-45).) La expresión de la mayoría de los genes también está regulada por elementos de DNA aún más distantes llamados **potenciadores**. Un potenciador normalmente contiene múltiples sitios de unión para activadores transcripcionales específicos de la secuencia. Los potenciadores a menudo se distinguen de los elementos promotores por una propiedad única: pueden situarse corriente arriba o corriente abajo del sitio de inicio e, incluso, pueden invertirse (rotar 180°), sin afectar la capacidad de un factor de transcripción unido para estimular la transcripción. La deleción de un potenciador puede disminuir el nivel de transcripción en 100 veces o más. Un gen típico de mamífero puede tener una serie de potenciadores dispersos dentro del DNA en las proximidades del gen. Diferentes potenciadores, por lo general, unen diferentes conjuntos de factores de transcripción y responden de forma independiente a diferentes estímulos. Algunos potenciadores se encuentran miles o, inclusive, decenas de miles de pares de bases corriente arriba o corriente abajo del gen cuya transcripción estimulan.[7]

[7] Existe una extensa variación en la terminología utilizada para describir los diversos tipos de elementos reguladores que controlan la transcripción genética. Los términos empleados aquí: promotor central, elementos promotores proximales, elementos promotores distales y potenciadores no se adoptan universalmente, pero describen elementos que suelen estar presentes y que, a menudo, pero no siempre, pueden distinguirse.

Aunque los potenciadores y promotores pueden estar separados por un gran número de nucleótidos, se cree que los potenciadores estimulan la transcripción influyendo en los eventos que ocurren en el promotor nuclear. Los potenciadores y promotores nucleares pueden acercarse, porque el DNA intermedio puede formar un ciclo a través de las interacciones de proteínas unidas (**FIGURA 12-48**). Si los potenciadores pueden interactuar con promotores a través de distancias tan largas, ¿qué impide que un potenciador se una a un promotor inapropiado ubicado incluso más abajo en la molécula de DNA? Un promotor y sus potenciadores están, en esencia, "acordonados" de otros elementos promotores/potenciadores mediante secuencias límites especializadas llamadas **aislantes**.

Una de las áreas más activas de la biología molecular en la última década se ha centrado en el mecanismo mediante el cual

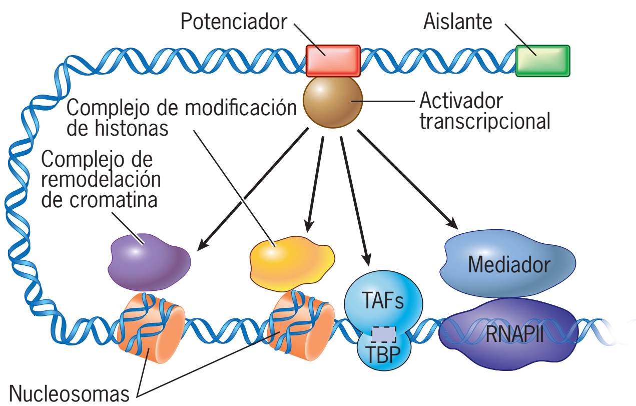



**FIGURA 12-48 Mecanismos mediante los cuales los activadores transcripcionales que se unen a sitios distantes pueden influir en la expresión genética.** Los activadores transcripcionales unidos a los potenciadores corriente arriba influyen en la expresión genética a través de la interacción con coactivadores. Aquí se representan cuatro tipos diferentes de coactivadores, dos de ellos, etiquetados como "complejo de modificación de histona" y "complejo de remodelación de cromatina", actúan alterando la estructura de la cromatina. Otros dos, etiquetados como "TAFs" y "Mediador", actúan sobre los componentes de la maquinaria de transcripción basal que se ensambla en el promotor nuclear. En las siguientes secciones se discuten estos diversos tipos de coactivadores.

un activador transcripcional unido a un potenciador puede estimular la iniciación de la transcripción en el promotor nuclear. Los factores de transcripción logran esta hazaña a través de la acción de intermediarios conocidos como **coactivadores**. Los coactivadores son complejos grandes que consisten en numerosas subunidades. Los coactivadores se pueden dividir ampliamente en dos grupos funcionales: 1) los que interactúan con los componentes de la maquinaria de transcripción basal (los factores de transcripción generales y la RNA polimerasa II) y 2) los que actúan sobre la cromatina, convirtiéndola de un estado que es relativamente inaccesible para la maquinaria de transcripción a un estado que es mucho más "amigable" con la transcripción. La figura 12-48 muestra un retrato esquemático de cuatro tipos de coactivadores, dos de cada uno de los grupos principales. Estos diversos tipos de coactivadores trabajan juntos, de una manera ordenada, para activar la transcripción de genes particulares en respuesta a señales intracelulares específicas. Dada la gran cantidad de factores de transcripción codificados en el genoma y la diversidad limitada de coactivadores, cada complejo coactivador funciona en conjunción con una gran variedad de diferentes factores de transcripción. El coactivador CBP, por ejemplo, que se analiza a continuación, participa en las actividades de cientos de diferentes factores de transcripción.

## Coactivadores que interactúan con la maquinaria de transcripción basal

La transcripción se logra mediante el reclutamiento y la colaboración posterior de grandes complejos proteicos. TFIID, uno de los GTF necesarios para el inicio de la transcripción (p. 417), consiste en una docena o más de subunidades. El componente clave es la proteína de unión TATA (TBP, *TATA binding protein*), que se une a la caja TATA. Su unión se ve facilitada por una serie de factores asociados denominados factores asociados a TBP (TAFs, *TBP-associated factors*). Se cree que algunos factores de transcripción influyen en los eventos en el promotor nuclear, al interactuar con una o más de estas subunidades TFIID. Otro coactivador que se comunica directamente entre los factores de transcripción unidos al potenciador y la maquinaria de transcripción basal se denomina mediador, que es un complejo enorme de múltiples subunidades que interactúa de manera directa con la RNA polimerasa II. El mediador es requerido por una amplia variedad de activadores transcripcionales y puede ser un elemento esencial en la transcripción, sino de todos, sí de la mayoría de los genes de codificación de proteína. A pesar del considerable esfuerzo, el mecanismo de acción de mediador sigue sin estar claro.

## Coactivadores que alteran la estructura de la cromatina

El descubrimiento de nucleosomas en la década de 1970 planteó una pregunta importante que aún no se ha respondido en su totalidad: ¿cómo pueden las proteínas que no son histonas (como los factores de transcripción y las RNA polimerasas) interactuar con el DNA que está fuertemente envuelto alrededor de las histonas nucleares? Un gran cuerpo de evidencia sugiere que la incorporación de DNA a los nucleosomas, de hecho, impide el acceso al DNA e inhibe, de manera marcada, las etapas de inicio y elongación de la transcripción. ¿Cómo superan las células este efecto inhibidor que resulta de la estructura de la cromatina?

Como se discutió en la página 466, cada una de las moléculas de histona del núcleo del nucleosoma tiene una cola N-terminal flexible que se extiende fuera de la partícula nuclear y más allá de la hélice del DNA. Antes se analizó también que las modificaciones covalentes de estas colas tienen un profundo impacto en la estructura y función de la cromatina. Se ha visto además el modo en que la adición de grupos metilo en los residuos de H3K9 puede promover la compactación de la cromatina y el silenciamiento transcripcional (p. 472). La adición de grupos acetilo a residuos específicos de lisina en histonas nucleares tiende a tener el efecto opuesto. En una escala mayor, se piensa que la acetilación de residuos de histonas previene que las fibras de cromatina se doblen en estructuras compactas, lo que ayuda a mantener regiones eucromáticas activas. En una escala menor, la acetilación de histonas aumenta el acceso de regiones específicas de la plantilla de DNA a las proteínas que interactúan, lo que promueve la activación transcripcional. Como se comprobará en breve, las enzimas que llevan a cabo estas modificaciones de histonas son parte de grandes complejos multiproteicos implicados en la regulación de la expresión genética.

En los últimos años se han desarrollado técnicas para determinar la naturaleza de las modificaciones en las histonas de los nucleosomas a escala de genoma completo. Estas técnicas implican una técnica ChIP similar a la ilustrada en la figura 12-46, pero en lugar de determinar la ubicación del genoma completo de factores de transcripción particulares, el objetivo es identificar las ubicaciones precisas de las modificaciones particulares de histonas dentro del genoma. En lugar de usar anticuerpos contra factores de transcripción, para precipitar una fracción particular de segmentos de DNA unidos a proteínas, los investigadores usan anticuerpos que reconocen específicamente modificaciones particulares de histonas, tales como H3K9 o H4K16 acetilado, o H3K4 o H3K36 metilado. Se sabía que las cuatro marcas de estas histonas estaban asociadas con genes activos transcripcionalmente (figura 12-18), pero no se sabía cómo estas marcas podrían distribuirse dentro de tales genes. ¿Las modificaciones de histonas específicas se distribuyen de manera uniforme a lo largo de cada gen, o hay diferencias de un extremo a otro?

Los resultados del análisis de genes activos en el genoma de levadura que se muestran en la **FIGURA 12-49** revelan diferencias marcadas dentro de diversas partes de estos genes. Las histonas H3 y H4 acetiladas y los residuos de H3K4 metilados están agrupados en las regiones promotoras y en gran parte ausentes del cuerpo principal de genes activos, lo que sugiere que estas modificaciones son sobre todo importantes en la activación de un gen o en el inicio de su transcripción. En contraste, los residuos de H3K36 metilados están largamente ausentes de los promotores y, en su lugar, se concentran en las regiones transcritas de genes activos. Varios estudios proporcionan una justificación para estas diferencias en la ubicación y dan un ejemplo de las complejas

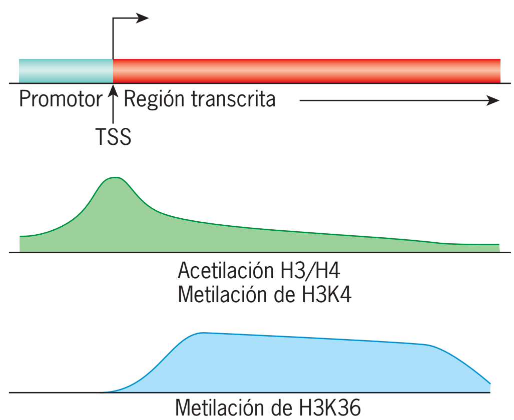



**FIGURA 12-49 Las modificaciones de histona pueden actuar como firmas de regiones de cromatina transcritas.** La figura muestra la localización selectiva de modificaciones de histonas dentro de la cromatina de genes transcritos basados en estudio del genoma completo en levadura. La acetilación de histonas y la metilación de H3K4 se localizan sobre todo en la región promotora de genes activos y disminuyen notablemente en la porción transcrita del gen. En contraste, la metilación de H3K36 muestra el patrón de localización opuesto. TSS (*transcription start site*), sitio de inicio de la transcripción.

relaciones entre las modificaciones de histonas. Como se describe en la página 418, el inicio de la transcripción se correlaciona con la fosforilación de los residuos de Ser5 en CTD de la RNA polimerasa II. Estos residuos Ser5 fosforilados sirven como una plataforma de reconocimiento para la histona metiltransferasa Set1, que metila H3K4 en la cromatina del promotor. Los residuos H3K4 metilados, a su vez, sirven como sitios de unión para una serie de complejos proteicos, incluidos los implicados en la remodelación de la cromatina (véase figura 12-54) y el empalme de premRNA (véase figura 11-30). Por el contrario, la metilación de H3K36 está catalizada por la histona metiltransferasa Set2, que viaja con la polimerasa alargada. Una vez que este residuo se metila, sirve como un sitio de reclutamiento para otro complejo enzimático (Rpd3S) que cataliza la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas en la porción transcrita del gen. La evidencia sugiere que la eliminación de los grupos acetilo de los nucleosomas en la estela de una RNA polimerasa alargada evita la iniciación inapropiada de la transcripción dentro de la región de codificación interna de un gen.

Miremos más de cerca los eventos que ocurren en las regiones promotoras de los genes durante la activación de la transcripción. Los grupos acetilo se agregan a residuos específicos de lisina en las histonas nucleares por una familia de enzimas llamadas **histonas acetiltransferasas (HAT, *histone acetyltransferases*)**. A finales de la década de 1990, se descubrió que varios coactivadores poseían actividad HAT. Si la actividad HAT de estos coactivadores fue eliminada por mutación, también lo fue su capacidad para estimular la transcripción. El descubrimiento de que los coactivadores contienen actividad HAT proporcionó un vínculo crucial entre la acetilación de histonas, la estructura de la cromatina y la activación de genes. La figura 12-50 muestra una serie ordenada de reacciones que se han propuesto que ocurren después de la unión de un activador transcripcional, como el receptor de glucocorticoides, a su elemento de respuesta en el DNA. Una vez unido al DNA, el activador recluta un coactivador (p. ej., CBP) en una región de la cromatina que se dirige a la transcripción. Una vez colocado en la región blanco, el coactivador acetila las histonas nucleares de los nucleosomas cercanos, lo que expone un sitio de unión para un complejo de remodelación de cromatina (que se analiza a continuación). Las acciones combinadas de estos diversos complejos aumentan la accesibilidad del promotor a los componentes de la maquinaria de transcripción, que se ensambla en el sitio donde se iniciará la transcripción.

La **FIGURA 12-50** representa la actividad de dos coactivadores que afectan el estado de la cromatina. Ya se ha visto cómo las HAT actúan para modificar las colas de histonas; démosle un vistazo más de cerca al otro tipo de coactivador, los **complejos de remodelación de la cromatina**. Los complejos de remodelación de cromatina usan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para alterar la estructura y ubicación de los nucleosomas a lo largo del DNA. Esto a su vez puede permitir la unión de varias proteínas a sitios reguladores en el DNA. Las máquinas de remodelación de cromatina mejor estudiadas son miembros de la familia SWI/SNF. Los complejos SWI/SNF, que constan de nueve a doce subunidades, no se unen a secuencias de DNA específicas, sino que se reclutan para promotores específicos mediante marcas epi-

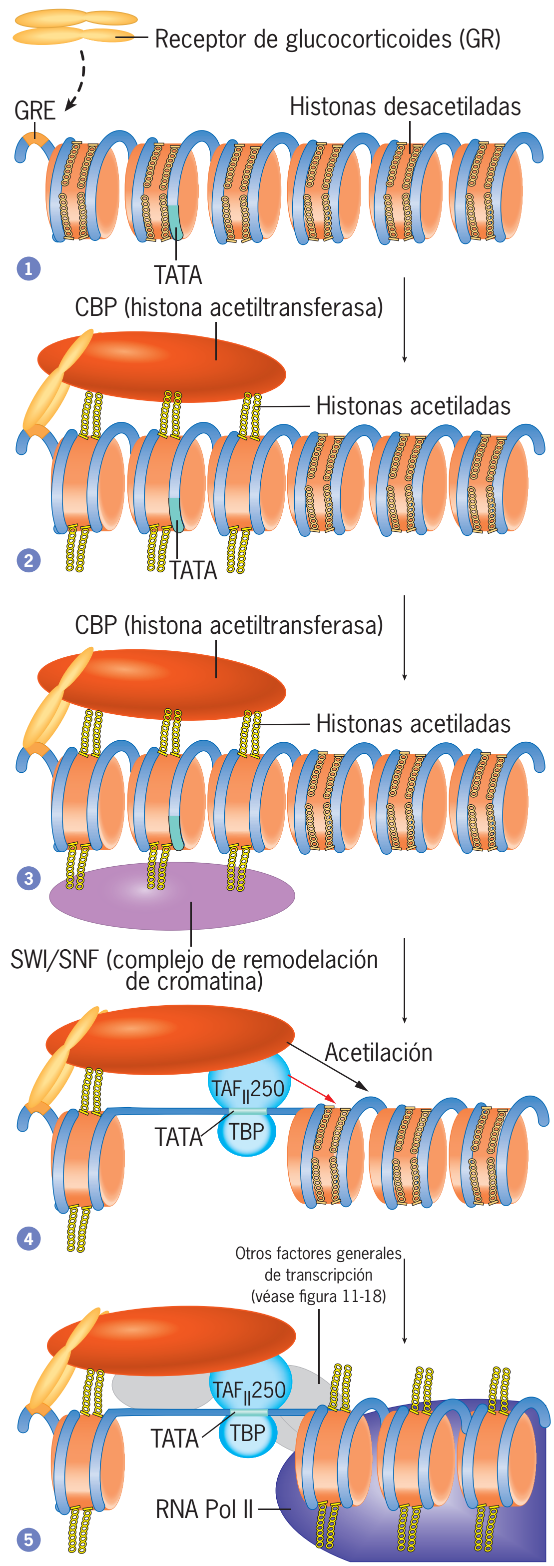



**FIGURA 12-50 Modelo que describe la activación de la transcripción.** Los factores de transcripción, como el receptor de glucocorticoides (GR), se unen al DNA y reclutan coactivadores, que facilitan el ensamblaje del complejo de preinicio de la transcripción. El paso 1 de este dibujo representa una región de un cromosoma que está en un estado reprimido, debido a la asociación de su DNA con histonas desacetiladas. En el paso 2, el GR está vinculado al GRE, y se ha reclutado el coactivador CBP. El CBP contiene una subunidad que tiene actividad de histona acetiltransferasa (HAT). Estas enzimas transfieren grupos de acetilo de un donador de acetil CoA a los grupos amino de residuos de lisina específicos en proteínas de histona. Como resultado, las histonas de las partículas nucleares del nucleosoma en las regiones corriente arriba y corriente abajo de la caja TATA se vuelven acetiladas. En el paso 3, las histonas acetiladas reclutan SWI/SNF, que es un complejo de remodelación de la cromatina. Juntos, los dos coactivadores CBP y SWI/SNF cambian la estructura de la cromatina a un estado más abierto y accesible. En el paso 4, TFIID se une a la región abierta del DNA. Una de las subunidades de TFIID (llamada TAFII250 o TAF1) también posee actividad de histona acetiltransferasa, como lo indica la flecha roja. Juntos, CBP y TAFII250 modifican nucleosomas adicionales, para permitir la iniciación de la transcripción. En el paso 5, los nucleosomas restantes del promotor se han acetilado, la RNA polimerasa II se une al promotor y la transcripción se establece para comenzar.

genéticas presentes en histonas nucleosómicas u otras proteínas ya unidas al DNA. En la figura 12-50, el coactivador CBP ha acetilado las histonas nucleares, proporcionando un sitio de unión de alta afinidad para el complejo de remodelación. Una vez reclutados para un promotor, se cree que los complejos de remodelación de la cromatina interrumpen las interacciones de histona-DNA, que pueden

1. Promover la movilidad del octámero de histona para que se deslice a lo largo del DNA a nuevas posiciones (**FIGURA 12-51**, vía 1). En el caso mejor estudiado, la unión de activadores transcripcionales a un potenciador corriente arriba del gen *IFN-β* conduce al deslizamiento de un nucleosoma clave de alrededor de 35 pares de bases a lo largo del DNA, exponiendo la caja TATA que había sido previamente cubierta por histonas. El deslizamiento ocurre cuando el complejo de remodelación se transloca a lo largo del DNA.
2. Cambiar la conformación del nucleosoma. En el ejemplo representado en la figura 12-51, vía 2, el DNA ha formado un asa transitoria o protuberancia en la superficie del octámero de histona, haciendo que ese sitio sea más accesible para la interacción con las proteínas reguladoras de unión al DNA.
3. Facilitar el reemplazo dentro del octámero de histona de una histona nuclear estándar por una variante de histona (p. 467) que se correlaciona con la transcripción activa. Por ejemplo, el complejo SWR1 intercambia dímeros H2A/H2B con una variante de histona (H2A.Z) que se dimeriza con H2B (figura 12-51, vía 3).
4. Desplazar el octámero de histonas del DNA por completo (figura 12-51, vía 4). Por ejemplo, se piensa que los nucleosomas se desmontan de manera temporal, a medida que un complejo de RNA polimerasa alargado se mueve a lo largo del DNA dentro de un gen.

Durante muchos años, se ha recopilado evidencia que demuestra que los nucleosomas no se colocan al azar a lo largo del DNA y, lo que es más importante, que el posicionamiento nucleosómico específico desempeña un papel importante en la regulación de la transcripción de regiones específicas del genoma. Se han realizado varios intentos para determinar si los nucleosomas

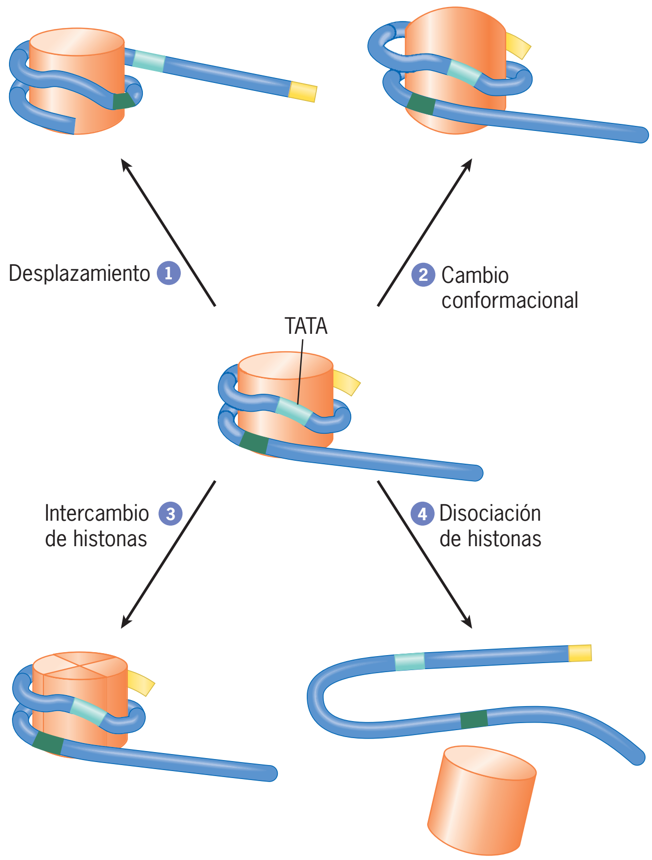



**FIGURA 12-51 Remodelación de cromatina.** En la vía 1, un nucleosoma clave se desliza a lo largo del DNA, exponiendo el sitio de unión TATA y permitiendo que se ensamble el complejo de preiniciación. En la vía 2, se ha reorganizado el octámero de histona de un nucleosoma. Aunque la caja TATA no está completamente libre de asociación de histonas, ahora puede unir las proteínas del complejo de preiniciación. En la vía 3, los dímeros H2A/H2B estándar de un nucleosoma se han intercambiado con variantes de histona (p. ej., dímeros de H2A.Z/H2B) que se asocian con la cromatina activa. En la vía 4, el octámero de histona se ha desensamblado y se ha perdido completamente del DNA.

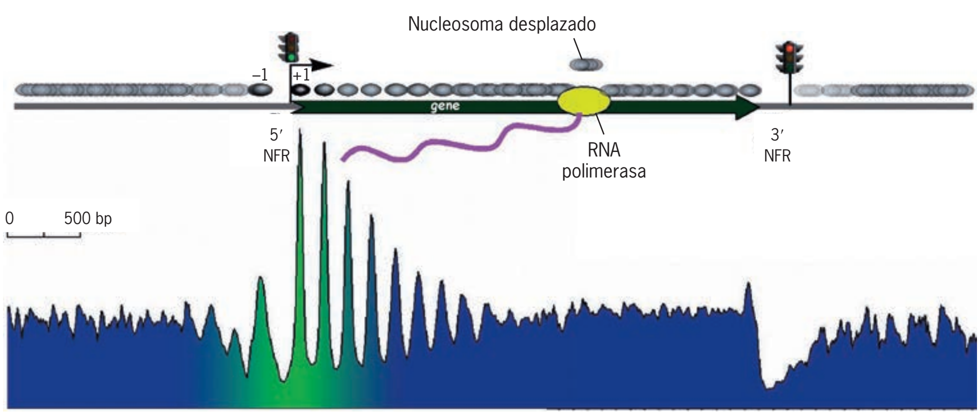



**FIGURA 12-52 Paisaje nucleosómico de los genes de levadura.** La parte superior de la ilustración muestra una región típica de DNA en la proximidad de un gen que está siendo transcrito activamente por un complejo de RNA polimerasa II. Las posiciones de consenso de los nucleosomas están ilustradas por los óvalos grises. La parte inferior de la ilustración muestra la distribución de nucleosomas a lo largo del DNA con la altura de la línea que refleja la probabilidad de que se encuentre un nucleosoma en ese sitio. La región 5‘ del gen tiene la arquitectura de cromatina más definida. Hay una probabilidad muy alta de que la región promotora esté desprovista de nucleosomas (una región libre de nucleosomas o NFR, *nucleosome-free region*), blanqueda por dos nucleosomas muy bien situados, que se encuentran a ambos lados del sitio de inicio de la transcripción (luz verde); estos dos nucleosomas se identifican como +1 y –1 en la parte superior de la figura. Los nucleosomas subsiguientes cerca del extremo 5‘ de la región transcrita también tienden a estar bien posicionados, como lo indican las distintas ubicaciones de estos nucleosomas en la parte superior de la figura. También se ve que un nucleosoma es desplazado por la RNA polimerasa, a medida que transcribe el gen. El sombreado verde corresponde a una región de cromatina con altos niveles de la variante de histona H2A.Z, acetilación de histonas alta y metilación de H3K4, y una alta probabilidad de posicionamiento nucleosomal.

FUENTE: Tomado de Cizhong Jiang y B Franklin Pugh. *Nature Revs Gen* 2009;10:164; © Copyright 2009, Macmillan Magazines Limited, adaptado de TN Mavrich, *et al*. *Genome Res* 2008;18:1074.

están preferentemente presentes o ausentes de sitios particulares dentro del genoma en un tipo dado de célula. Para llevar a cabo estos estudios, es usual que la cromatina se trate con una nucleasa que digiere aquellas partes del DNA que no están protegidas por su asociación con los octámeros de histona. El DNA que ha sido protegido de la digestión con nucleasas se disocia luego de sus histonas asociadas y se secuencia. Estas técnicas han permitido a los investigadores preparar mapas genómicos completos de posiciones de nucleosomas a lo largo del DNA. Los análisis más completos del posicionamiento de nucleosomas se han llevado a cabo en células de levadura, y proporcionan una imagen algo diferente de la visión tradicional, que se basa en años de estudios bioquímicos sobre la transcripción de genes individuales en células de mamíferos, que se presentan en la figura 12-50.

Los estudios sobre células de levadura sugieren que la mayoría de los genes comparten una arquitectura de cromatina común, la cual se representa en la **FIGURA 12-52**. En ella se indica que los nucleosomas no están distribuidos de manera aleatoria a lo largo del DNA, sino que están sorprendentemente bien posicionados. Lo más notable es que las secuencias promotoras tienden a residir dentro de regiones sin nucleosomas (NFR de la figura 12-52), que están flanqueadas en ambos lados por dos nucleosomas muy bien posicionados identificados como +1 y –1 en la figura 12-52. Es probable que la región libre de nucleosomas que rodea al promotor sea una consideración importante, al permitir el acceso de los factores reguladores a estos sitios blanco en el DNA. De todos los nucleosomas en un gen de levadura, el nucleosoma-1 experimenta las modificaciones más extensas en la activación transcripcional. Este nucleosoma puede ser movido a un nuevo sitio, desalojado del DNA o sometido a extensas modificaciones o intercambio de histonas. Los nucleosomas corriente abajo (+1, +2, +3, etc.) también están sujetos a muchas de estas mismas alteraciones durante la activación transcripcional, pero el grado en que se afecta un nucleosoma disminuye con la distancia a la que se encuentra desde el sitio de inicio de la transcripción. No está claro aún si las regiones promotoras de la mayoría de los genes *no transcritos* en eucariotas superiores tienden a estar relativamente cubiertas en nucleosomas, como se muestra en la figura 12-50 (referidas como "promotores cerrados") o relativamente libres de nucleosomas, como se sugiere en la figura 12-52 (referidas como "promotores abiertos"). Incluso si el sitio de inicio de la transcripción está cubierto por un nucleosoma, los estudios sugieren que este nucleosoma puede ser menos estable que sus vecinos, que contienen variantes de histonas (H3.3 y H2A.Z), en lugar de las histonas nucleares estándar. Independientemente de la topología nucleosómica específica, las regiones promotoras de la cromatina son el objetivo de una amplia variedad de enzimas modificadoras de histonas (p. ej., histonas acetiltransferasas, desacetilasas, metiltransferasas y desmetilasas), complejos de remodelación de la cromatina (p. ej., SWI/SNF) y factores de transcripción de genes específicos.

**REPASO**

1. ¿De qué dos formas diferentes pueden los coactivadores influir en la expresión genética?

## 12.16 Activación transcripcional de polimerasas pausadas

A lo largo de esta discusión sobre activación transcripcional, hemos descrito cómo los factores de transcripción se unen a secuencias de DNA específicas e inducen el reclutamiento de factores de transcripción generales (GTF, *general transcription factors*), complejos de modificación de cromatina y RNA polimerasa II, lo que conduce al inicio de la transcripción. Fue una sorpresa saber que las RNA polimerasas también están ligadas a los promotores de muchos genes que no muestran evidencia de que se transcriban. En algunos casos, una RNA polimerasa situada en uno de estos genes "transcripcionalmente silenciosos" inicia la síntesis de RNA, pero la polimerasa no pasa a la etapa de elongación de la transcripción. En otros casos, la polimerasa continúa sintetizando un RNA de aproximadamente 30 nucleótidos y luego se detiene. En cualquier caso, nunca se genera una transcripción primaria de longitud completa. Según un modelo, las moléculas de RNA polimerasa situadas corriente abajo de los promotores se mantienen en estado de pausa mediante factores inhibidores unidos (p. ej., DSIF y NELF). La inhibición luego se alivia ya que 1) estos factores se fosforilan mediante cinasas estimuladoras (p. ej., P-TEFb) y 2) factores de elongación (p. ej., ELL) se reclutan en la polimerasa (como en la figura 11-18). Estos estudios han sugerido que algunos factores de transcripción (p. ej., Myc) pueden estimular la transcripción de algunos genes, actuando al nivel de prolongación de la transcripción, así como en el inicio de la transcripción. Debido a que no requiere el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en el promotor, la liberación inducida de polimerasas pausadas puede facilitar la activación rápida de genes, en respuesta a señales de desarrollo o ambientales.

**REPASO**

1. ¿Cuál es una posible ventaja de regular un gen controlando el alargamiento mediante una RNA polimerasa ya unida?

## 12.17 Represión transcripcional

Como se desprende de las figuras 12-2 y 12-3, el control de la transcripción en las bacterias depende, en gran medida, de los represores que bloquean la transcripción. Aunque la investigación en eucariotas se ha centrado principalmente en factores que activan o mejoran la transcripción de genes específicos, las células eucariotas también poseen mecanismos reguladores negativos.

Se ha visto que la activación transcripcional se asocia con cambios en el estado y/o posición de los nucleosomas en una región particular de la cromatina. El estado de acetilación de la cromatina es una propiedad dinámica; del mismo modo que existen enzimas (HAT) para agregar grupos acetilo, también hay enzimas para eliminarlos. La eliminación de los grupos acetilo se lleva a cabo mediante **desacetilasas de histonas (HDACs, *histone deacetylases*)**. Mientras que las HAT están asociadas con la activación transcripcional, las HDAC se asocian con la represión transcripcional. Las HDAC están presentes como subunidades de complejos más grandes descritos como correpresores. Los correpresores son similares a los coactivadores, excepto que son reclutados a *loci* genéticos específicos por factores transcripcionales (represores) que provocan que el gen específico sea silenciado en lugar de activado (**FIGURA 12-53**). La progresión de varios tipos de cáncer puede depender de que las células tumorales sean capaces de reprimir la actividad de ciertos genes. En la actualidad se están probando varios fármacos contra el cáncer (p. ej., Zolinza), que actúan inhibiendo las enzimas HDAC.

Estudios recientes indican que la eliminación de los grupos acetilo de las colas de histonas se acompaña de otra modificación de la histona: la metilación del residuo de lisina en la posición núm. 9 de las moléculas de la histona H3. Puede recordar que esta modificación, H3K9me, se discutió extensamente en la página 472 como un evento clave en la formación de heterocromatina. Ahora parece que esta misma modificación también está involucrada en los tipos más dinámicos de represión transcripcional

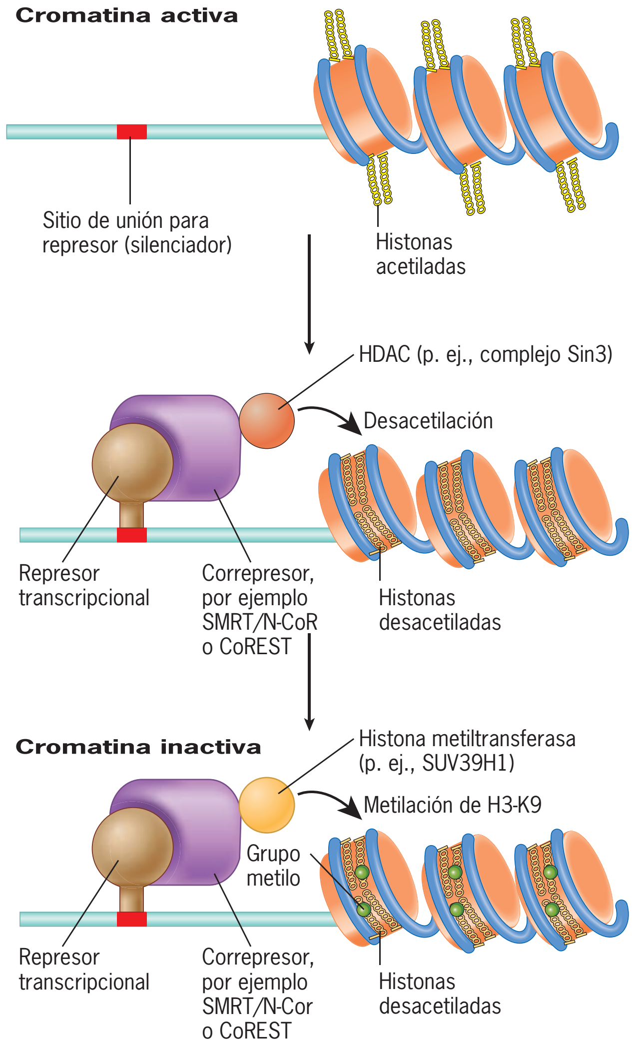
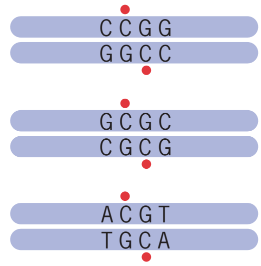



**FIGURA 12-53 Modelo para la represión transcripcional.** Las colas de histonas en las regiones promotoras de la cromatina activa suelen estar fuertemente acetiladas. Cuando un represor transcripcional se une a su sitio de unión al DNA, recluta un complejo de correpresores (p. ej., SMRT/N-CoR o CoREST) y una actividad de HDAC asociada. La HDAC elimina los grupos acetilo de las colas de histonas. Una proteína separada que contiene actividad de metiltransferasa de histona agrega grupos metilo al residuo K9 de las colas de histona H3. En conjunto, la pérdida de grupos acetilo y la adición de grupos metilo conducen a la inactivación de la cromatina y al silenciamiento genético.

que ocurren dentro de las regiones eucromáticas del genoma. La figura 12-53 sugiere uno de los numerosos modelos posibles de represión transcripcional que incorpora varios aspectos de la modificación de la cromatina.

## Metilación del DNA

Uno de los factores clave para silenciar una región del genoma implica un fenómeno conocido como metilación del DNA. El examen del DNA de mamíferos y otros vertebrados indica que, en la mayoría de los casos, uno de cada 100 nucleótidos contiene un grupo metilo adicional, que siempre está unido al carbono 5 de una citosina. Los grupos metilo se agregan al DNA mediante una familia de enzimas llamadas DNA *metiltransferasas* codificadas en los humanos por genes DNMT. Se cree que esta simple modificación química sirve como una marca epigenética o "etiqueta" que permite que determinadas regiones del DNA sean identificadas y utilizadas de forma diferente a otras regiones. En los mamíferos, los residuos de metilcitosina son parte de un dinucleótido 5′-CpG-3′ dentro de una secuencia simétrica, tal como




en la que los puntos rojos indican las posiciones de los grupos metilo.[8] Como una verdadera marca epigenética, el patrón de metilación del DNA debe mantenerse mediante divisiones celulares repetidas. Esto se logra a través de una enzima, Dnmt1, que viaja con la horquilla de replicación y metila las cadenas de DNA hijas, copiando el patrón de metilación de las cadenas parentales.

La mayoría de los residuos de metilcitosina en el DNA de mamífero se encuentra dentro de secuencias repetidas no codificantes, principalmente elementos transponibles (p. 392). Se piensa que la metilación mantiene estos elementos en un estado inactivo. Los organismos que albergan mutantes DNMT tienden a exhibir un marcado aumento en la actividad de transposición, que puede ser perjudicial para la salud del organismo. Como se discutió en la página 435, los piRNA sirven como mediadores de la supresión del elemento transponible en las células germinales. Durante la formación de los gametos masculinos (es decir, durante la espermatogénesis), los piRNA actúan guiando la maquinaria de metilación del DNA a los sitios donde los elementos transponibles residen dentro del genoma.

Además de la supresión general de los elementos transponibles, la metilación del DNA ha estado implicada, durante mucho tiempo, en la represión de la transcripción de genes específicos. En los últimos años, se han desarrollado técnicas para determinar los residuos de citosina específicos que están metilados en cualquier población de células dada en todo el genoma. Estos estudios confirman que 1) las regiones promotoras de genes inactivos tienden a estar más metiladas que las regiones promotoras de genes activos y 2) los patrones de metilación del DNA varían de un tipo de célula a otro, lo que refleja la actividad diferencial de genes entre varios tejidos. La mayoría de la evidencia sugiere que la metilación del promotor de un gen sirve más para mantener ese gen en un estado inactivo, que como un mecanismo para la inactivación inicial. Como ejemplo, la inactivación de los genes en uno de los cromosomas X de las hembras de mamíferos (p. 470) ocurre antes de una ola de metilación de promotores de genes, que se cree que transforma el DNA en una condición reprimida de manera más permanente.

¿Cómo determina una célula en particular qué promotores deben metilarse y cómo la metilación de estos promotores impone el estado transcripcionalmente reprimido de ese gen? La metilación del DNA se ha relacionado de modo estrecho con otra marca epigenética represiva: la metilación de histonas. Puede ser que la inactivación genética comience con el establecimiento de un patrón represivo transcripcional de modificaciones de histonas en las histonas nucleares de las regiones promotoras, y que estas colas de histonas modificadas luego recluten la maquinaria de metilación del DNA a esos nucleosomas. Una vez que el DNA

[8] Se encuentra una excepción en las células madre embrionarias, donde cerca de una cuarta parte de las metilaciones ocurren en un contexto no CpG, que incluye CpA y CpT. En algunos sitios, la metilcitosina se puede convertir enzimáticamente en hidroximetilcitosina, que puede representar un intermediario en el proceso de desmetilación del DNA o una marca epigenética alternativa.

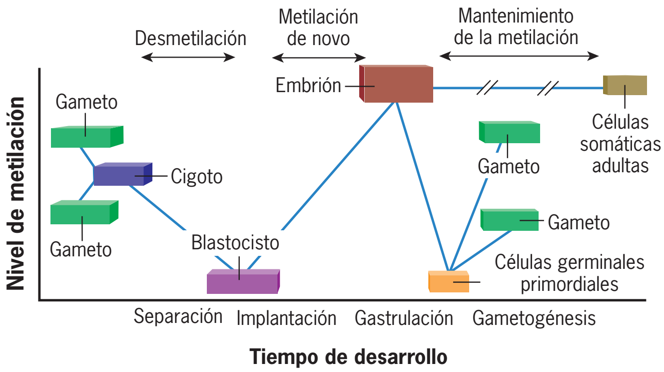



**FIGURA 12-54 Cambios en los niveles de metilación del DNA durante el desarrollo de mamíferos.** El DNA del óvulo fecundado (cigoto) está sustancialmente metilado. Durante la escisión, el genoma sufre una desmetilación global. Es curioso que el DNA heredado del padre se someta a desmetilación en una etapa más temprana y por un mecanismo diferente al DNA heredado de la madre. Después de la implantación, el DNA se somete a una nueva metilación (*de novo*), que se mantiene en las células somáticas a un alto nivel durante el resto del desarrollo y la edad adulta. Por el contrario, el DNA de las células germinales primordiales, que dan origen a los gametos en el adulto, se desmetila con posterioridad. El DNA de las células germinales luego se vuelve a metilar en etapas ulteriores de la formación del gameto.

FUENTE: Basado en una figura de R Jaenisch. *Trends Genetics* 1997;13-325, copyright 1997. Trends in Genetics de Elsevier Ltd. Reproducido con permiso de Elsevier Ltd. en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

en estas regiones se metila, los residuos de citosina metilados pueden servir como sitios de unión para reclutar enzimas adicionales que modifican las histonas que reprimen y compactan más la cromatina de ese promotor (como en la figura 12-53).

Aunque la metilación del DNA es una marca epigenética relativamente estable, la transmisión de estas marcas de una célula parental a sus hijas está sujeta a regulación. En la **FIGURA 12-54** se representan los cambios sustanciales en los niveles de metilación del DNA que ocurren durante la vida de un mamífero. El primer cambio importante en el nivel de metilación se produce entre la fertilización y las primeras divisiones del cigoto, cuando el DNA pierde las "etiquetas" de metilación que se heredaron de la generación anterior. Luego, más o menos cuando el embrión se implanta en el útero, una oleada de metilación nueva (o *de novo*) se propaga a través de las células, estableciendo un nuevo patrón de metilación en todo el DNA. No conocemos las señales que determinan si un gen dado en una célula en particular está destinado a la metilación o si se libra en este momento. Sin embargo, es evidente que los patrones anormales de metilación del DNA a menudo se asocian con la enfermedad. Por ejemplo, el desarrollo de tumores depende con frecuencia de la metilación aberrante y el posterior silenciamiento de genes cuya expresión normalmente suprimiría el crecimiento tumoral.

La metilación del DNA no es un mecanismo universal para inactivar genes eucariotas. La metilación del DNA no se ha encontrado, por ejemplo, en levaduras o nemátodos. El DNA de la planta, en contraste, a menudo está muy metilado, y los estudios en células de plantas cultivadas indican que, como en los animales, la metilación del DNA se asocia con la inactivación genética. En experimento, las plantas tratadas con compuestos que interfieren con la metilación del DNA produjeron un gran número de hojas y tallos de flores. Además, las flores que se desarrollaron en estos tallos tenían una morfología marcadamente alterada.

Uno de los ejemplos más radicales del papel de la metilación del DNA en el silenciamiento de la expresión genética ocurre como parte de un fenómeno epigenético conocido como impronta genómica, que es exclusivo de los mamíferos.

## Impronta genómica

Hasta mediados de la década de 1980, se suponía que el conjunto de cromosomas heredados de un progenitor masculino era funcionalmente equivalente al conjunto correspondiente de cromosomas heredados del progenitor femenino. Pero, como ha ocurrido con muchas otras suposiciones de larga data, se demostró que esto no era verdadero. En cambio, ciertos genes son activos o inactivos durante el desarrollo temprano de los mamíferos, únicamente en dependencia de si fueron transportados al cigoto por el esperma o el óvulo. Por ejemplo, el gen que codifica un factor de crecimiento fetal llamado IGF2 sólo está activo en el cromosoma transmitido por el progenitor masculino. Por el contrario, el gen que codifica un canal de potasio específico (KVLQT1) sólo está activo en el cromosoma que transmite el progenitor femenino. Se dice que los genes de este tipo están **impresos** de acuerdo con su origen parental. La impronta puede considerarse un fenómeno epigenético (p. 480), porque las diferencias entre alelos se heredan de los padres, pero no se basan en diferencias en la secuencia de DNA. Se estima, basándose sobre todo en el estudio de ratones mutantes, que el genoma de mamífero contiene, al menos, 80 genes impresos que se localizan principalmente en varios grupos cromosómicos distintos.

Se piensa que los genes se imprimen como resultado de la metilación selectiva del DNA de ciertas regiones que controlan la expresión de los alelos masculino o femenino. Como resultado, las versiones materna y paterna de genes impresos difieren, de manera consistente, en su grado de metilación. Además, los ratones que carecen de una DNA metiltransferasa clave (Dnmt1) son incapaces de mantener el estado impreso de los genes que heredan. El estado de metilación de los genes impresos no se ve afectado por las olas de desmetilación y remetilación que atraviesan el embrión temprano (figura 12-54). En consecuencia, los mismos alelos que están inactivos debido a la impronta en el óvulo fertilizado, estarán inactivos en las células del feto y en la mayoría de los tejidos adultos. La principal excepción ocurre en las células germinales, donde las huellas heredadas de los padres se borran durante el desarrollo temprano y luego se restablecen cuando ese individuo comienza a producir sus propios gametos. Debe existir algún mecanismo por el cual los genes específicos (p. ej., *KVLQT1*) se seleccionen para la inactivación durante la formación del esperma, mientras que otros genes (p. ej., *IGF2*) se seleccionan para la inactivación durante la formación del huevo. Cada uno de los grupos de genes impresos produce, al menos, un RNA no codificante. Estos RNA desempeñan un papel clave en la dirección del silenciamiento de los genes cercanos en varios de los grupos.

Las alteraciones en los patrones de impronta han sido implicadas en una serie de trastornos genéticos humanos raros, en particular aquellos que involucran un grupo de genes impresos que residen en el cromosoma 15. El síndrome de Prader-Willi (PWS, *Prader-Willi syndrome*) es un trastorno neurológico heredado, que se caracteriza por retraso mental, obesidad y subdesarrollo de las gónadas. El trastorno a menudo ocurre cuando el cromosoma 15 heredado del padre lleva una deleción en una pequeña región que contiene los genes impresos. Debido a que el cromosoma paterno tiene una deleción de uno o más genes y el cromosoma materno tiene la versión inactiva e impresa de la región homóloga, el individuo carece de una copia funcional del (los) gen(es). Aunque los genes suelen estar impresos para toda la vida de un individuo, se conocen casos en los que se puede perder la impresión. De hecho, la pérdida de impresión del gen *IGF2* ocurre en, aproximadamente, 10% de la población, lo que conduce a un aumento de la producción del factor de crecimiento codificado. Las personas con esta alteración epigenética corren un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal. Se ha descubierto el caso de una mujer que, debido a una supuesta deficiencia de una enzima de metilación del DNA, produjo ovocitos totalmente carentes de genes impresos. Cuando se fertilizaron, estos ovocitos no

pudieron desarrollar la implantación anterior, lo que demuestra la naturaleza esencial de esta contribución epigenética.

¿Qué papel podría desempeñar la impronta genómica en el desarrollo de un embrión? Aunque existen ideas diferentes sobre esta cuestión, no hay una respuesta definitiva. Según un investigador, la impronta genómica es un "fenómeno en busca de una razón", que es donde se queda el asunto.



## RNA largos no codificantes (lncRNA) como represores transcripcionales

Como se analiza en la página 436, una gran fracción del genoma de los mamíferos se transcribe en los RNA, entre ellos miles de especies que son lo suficientemente grandes como para ser descritas como RNA largos no codificantes o lncRNA. Las funciones de un puñado de lncRNA se han estudiado bien, incluidas varias especies involucradas en la impronta genómica o en la inactivación del cromosoma X. Estos estudios sugieren que los lncRNA sirven como moléculas específicas de secuencia, que pueden guiar los complejos proteicos a sitios específicos en la cromatina. Al igual que *XIST* (p. 470), la mayoría de los lncRNA parecen tener un papel en la orquestación de la represión transcripcional, aunque algunos lncRNA pueden funcionar, en cambio, en la activación transcripcional en algunos *loci*.

Un ejemplo de represión genética mediada por lncRNA se observa en la expresión de genes *HOX* humanos, cuyas proteínas codificadas desempeñan un papel clave en la determinación del eje anterior-posterior del embrión temprano. El extremo 5′ del lncRNA *HOTAIR* (que se transcribe desde el *locus HOXC* en el genoma humano) se une al complejo PRC2, mientras que el extremo 3′ de este lncRNA se une al complejo COREST. PRC2 contiene una histona metiltransferasa que es específica para el residuo K27 en las colas de las histonas nucleares H3. La metilación de H3K27 es una modificación represiva que mantiene el estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina de aquellos genes a los que se ha añadido. CoREST es un complejo correpresor que se muestra en la figura 12-53. En esa situación, CoREST actuó como correpresor a través de su asociación con una histona desacetilasa. En el presente caso que se muestra en la **FIGURA 12-55**, CoREST está asociado con una histona desmetilasa que elimina los grupos metilo de los residuos K4 de la histona H3. Como se indica en la figura 12-49, H3K4 metilada es una marca de genes transcripcionalmente activos, y, en consecuencia, la eliminación de los grupos metilo añadidos conduce a la represión de la transcripción. HOTAIR guía estos dos complejos proteicos represivos a otro *locus* (*HOXD*) situado en un cromosoma diferente. Mientras están atados al *locus* blanco *HOXD*, PRC2 y CoREST modifican la cromatina adyacente e inhiben su transcripción. Este no es un caso aislado: el análisis ChIP-chip del genoma completo (p. 493) indica que más de 700 genes en fibroblastos humanos están ocupados tanto por PRC2 como por CoREST, y que HOTAIR proporciona el enlace entre los dos complejos.

Se propone que los lncRNA pueden actuar como andamios para mantener complejos de proteínas en estrecha asociación con sitios blanco específicos en el genoma, donde pueden llevar a cabo sus funciones de modificación de la cromatina. Cuando la expresión de grandes cantidades de lncRNA se bloquea selectivamente, los patrones de expresión genética de las células afectadas se pueden alterar de manera drástica, lo que sugiere que estas moléculas de RNA pueden desempeñar un papel general en la regulación de la expresión genética. Estos reguladores de genes pueden tener roles biológicos importantes. Por ejemplo, cuando la transcripción de ciertos lncRNA se bloquea en las células madre embrionarias, las células pierden su estado pluripotente (p. 18) y expresan genes característicos de linajes específicos que normalmente serían reprimidos. Los lncRNA están emergiendo como jugadores importantes en enfermedades como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, la sobreexpresión de HOTAIR se observa en muchos tipos de tumores, y los altos niveles de expresión de HOTAIR se correlacionan con un mal pronóstico. No está claro si estos cambios son simplemente correlaciones o si muestran un papel real del lncRNA en la progresión de la enfermedad, pero los experimentos con crecimiento de células cancerosas en cultivo han demostrado que la reducción de la expresión del lncRNA vinculado al cáncer puede disminuir la proliferación celular y aumentar la muerte celular. Las enfermedades genéticas hereditarias también pueden ser el resultado de cambios en la expresión de lncRNA. Por ejemplo, un defecto genético en la formación de la placenta es causado por cambios en un lncRNA que se conoce como HELLPAR.

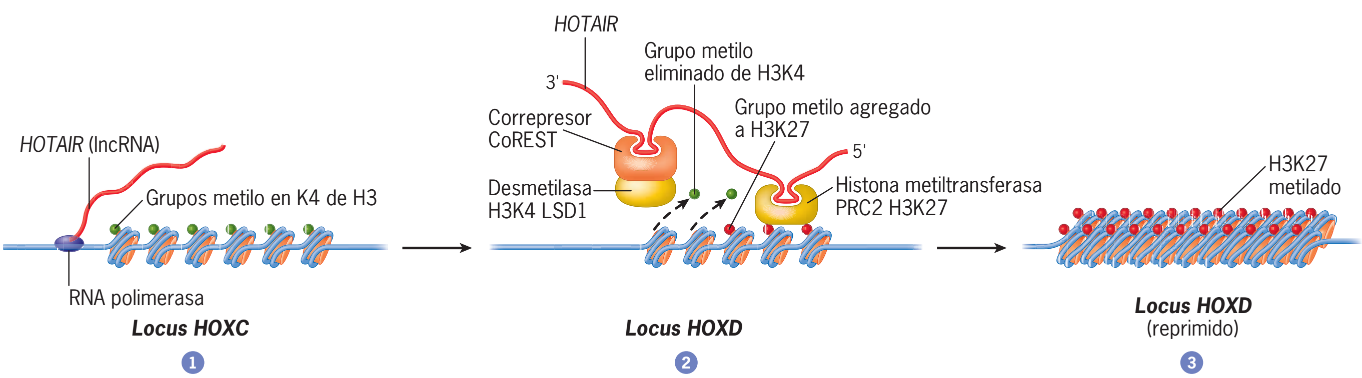



**FIGURA 12-55 Un lncRNA que actúa como un mediador de la represión transcripcional.** En el paso 1, el lncRNA *HOTAIR* se transcribe desde una parte del *locus HOXC* localizado en el cromosoma humano 12. En el paso 2, el RNA *HOTAIR* ha adoptado una estructura secundaria que le permite interactuar con complejos proteicos específicos, que actuarán en el *locus HOXD* localizado en el cromosoma humano 2. El extremo 3′ del lncRNA se une específicamente al complejo correpresor CoREST, que está asociado con la enzima LSD1, que elimina los grupos metilo de los residuos H3K4 de los nucleosomas, lo que produce la eliminación de una marca epigenética transcripcionalmente activa. Mientras tanto, el extremo 5′ de *HOTAIR* se une específicamente al complejo PRC2 (un complejo proteico del grupo Polycomb) que tiene una subunidad enzimática que agrega grupos metilo a los residuos H3K27, que es una marca epigenética transcripcionalmente represiva. Debido a la desmetilación de H3K4 y a la metilación de H3K27, el *locus HOXD* está reprimido transcripcionalmente y ha adoptado una conformación compacta (paso 3).

## REPASO

1. ¿Qué se entiende por el término epigenético? ¿Cómo es posible que fenómenos tan diversos como la metilación de la histona, la metilación del DNA y la determinación del centrómero puedan describirse como epigenéticos?
2. ¿Cómo la metilación del DNA afecta la expresión genética? ¿Cómo se relaciona con la acetilación o la metilación de histonas? ¿Qué se entiende por impronta genómica?
3. ¿Cuál es la diferencia entre HDAC y HAT?

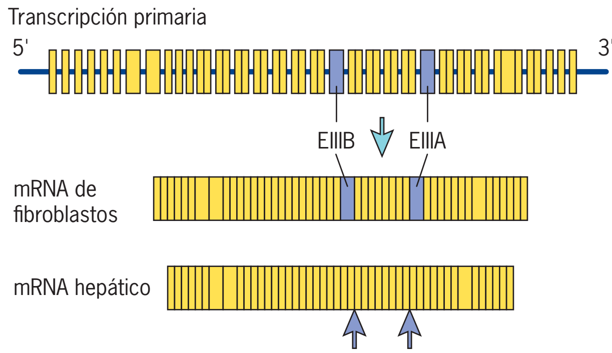



**FIGURA 12-56 Empalme alternativo del gen de la fibronectina.** El gen de la fibronectina consiste en una serie de exones que se muestran en el dibujo superior (los intrones que se muestran en negro no están dibujados a escala). Dos de estos exones codifican porciones del polipéptido llamado EIIIA y EIIIB, que están incluidas en la proteína producida por los fibroblastos, pero que están excluidas de la proteína que se produce en el hígado. La diferencia se debe a un empalme alternativo; aquellas porciones del premRNA que codifican estos dos exones se suprimen de la transcripción en las células hepáticas. Las flechas indican los sitios de los exones faltantes en el mRNA del hígado.

## 12.18 Control del procesamiento de RNA

Una vez que se transcribe un RNA, por lo general debe someterse a una serie de eventos de procesamiento, antes de que pueda funcionar. Esto es, en particular, cierto en el caso de los mRNA, que deben tener una estructura de casquete agregado en 5′ (véase figura 11-19), estar empalmados correctamente y tener una cola intacta de poli(A) en el extremo 3′. Cada uno de estos eventos debe estar regulado de manera adecuada, para permitir que el mRNA salga del núcleo y sirva como plantilla para el ensamblaje de proteínas. Los genes de plantas y animales complejos contienen numerosos intrones y exones, y los intrones deben ser eliminados con precisión, para permitir el transporte a través del poro nuclear. Sin embargo, el patrón de eliminación de intrones puede estar sujeto a una regulación espectacular, lo que permite múltiples productos de proteínas del mismo gen. La vía particular de empalme que se sigue puede depender de la etapa particular de desarrollo o del tipo de célula o tejido en particular que se considere. En el caso más simple, un exón específico puede ser retenido o empalmado fuera de la transcripción. Un ejemplo de este tipo de empalme alternativo se produce durante la síntesis de fibronectina, una proteína que se encuentra tanto en el plasma sanguíneo como en la matriz extracelular (**FIGURA 12-56**). La fibronectina producida por los fibroblastos y retenida en la matriz está codificada por un mRNA que contiene dos exones adicionales, en comparación con la versión de la proteína producida por las células hepáticas y secretada a la sangre. Los péptidos adicionales están codificados por porciones del premRNA que se retienen durante el procesamiento en el fibroblasto, pero se eliminan durante el procesamiento en la célula hepática.

Se observa un patrón más complicado en el gen *Dscam*, que codifica una familia de moléculas de adhesión celular, que se expresan en la superficie celular y funcionan en la guía del axón durante el desarrollo neuronal temprano en las moscas de la fruta. Un homólogo ha sido implicado en las características del síndrome de Down en los humanos. En las moscas de la fruta, este gen consta de 24 exones, pero incluye múltiples versiones alternativas de los exones 4, 6, 9 y 17 (**FIGURA 12-57**). Es sorprendente que, como resultado de los patrones combinatorios que se pueden generar al seleccionar uno de los exones variables, un único gen *Dscam* pueda codificar hasta 38 106 moléculas de adhesión celular diferentes. El genoma de la mosca de la fruta sólo contiene

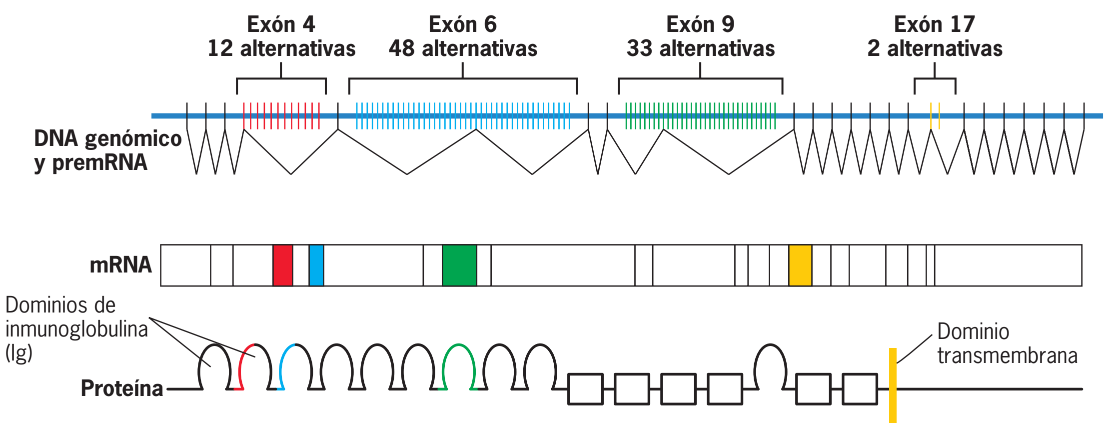



**FIGURA 12-57 Ejemplo más complejo de empalme alternativo.** La mayoría de los genes eucariotas están sujetos a un empalme alternativo. El gen *Dscam* de *Drosophila* ilustra la diversidad de proteínas que se pueden generar mediante el empalme alternativo de transcripciones de un solo gen. La línea superior muestra la organización del premRNA y el DNA genómico. El gen contiene 24 exones, pero una transcripción primaria dada sólo contiene una de las múltiples posibilidades de cada uno de los grupos 4, 6, 9 y 17 del exón. La línea media muestra la madurez en el mRNA con el exón seleccionado de cada uno de estos cuatro grupos representados en un color diferente. La línea inferior muestra la estructura del dominio de la proteína codificada. Los exones 4 y 6 codifican porciones de dos de los dominios Ig de la proteína, el exón 9 codifica un dominio Ig diferente, y el exón 17 codifica el dominio transmembrana de la proteína. Combinando todas las posibilidades, el gen *Dscam* puede codificar 38 106 mRNA posibles. A modo de comparación, el genoma completo de la mosca de la fruta sólo contiene alrededor de 14 000 genes.

FUENTE: DL Black. *Cell* 2000;103:368, fig. 1; *Cell* by Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

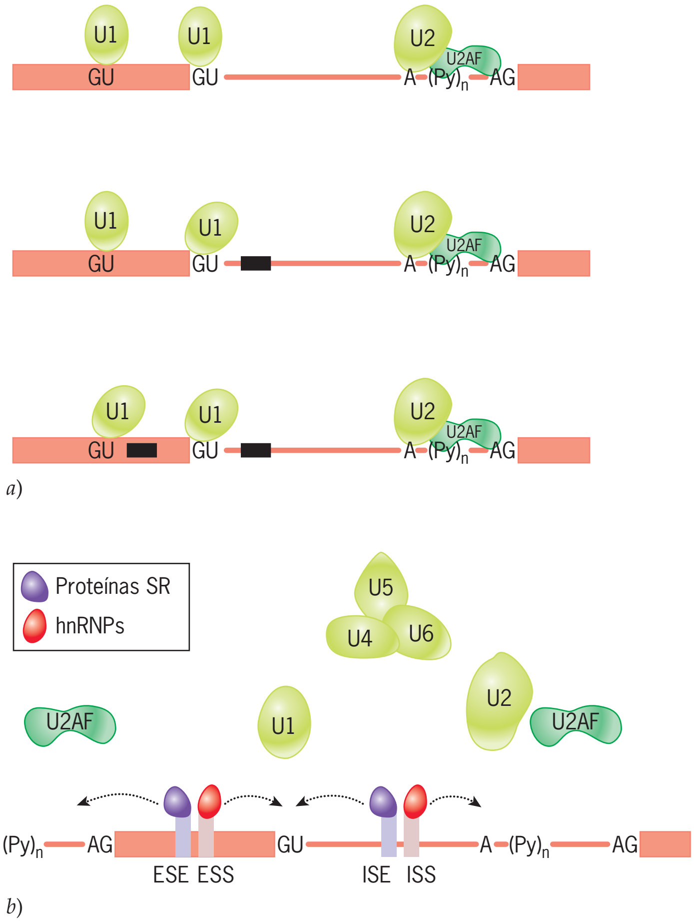



**FIGURA 12-58 Mecanismos de empalme alternativo.** *a*) Los cambios en la secuencia de un sitio de empalme de 5′ pueden afectar el emparejamiento con el snRNA U1. Esto puede perturbar la cinética del empalme, al permitir que los sitios con mejores coincidencias con U1 recluten el espliceosoma para un sitio de empalme 5′ sobre otro. En esta figura, están presentes dos posibles sitios de empalme 5′, como lo indican los dos dinucleótidos GU. La línea negra indica los segmentos de la transcripción que se ligarán después de la escisión de la sección intermedia. En la ilustración superior, la maquinaria de empalme ha reconocido el segundo de los dos posibles sitios de empalme 5′. En el dibujo del centro, se ha producido un cambio en la secuencia (indicado por el rectángulo negro) en la región del segundo sitio de empalme 5′ potencial, y la maquinaria de empalme ahora reconoce el primer sitio de empalme. En el dibujo inferior, se ha introducido un segundo cambio de secuencia en la región del primer sitio de empalme 5′ potencial, lo que hace que la maquinaria de empalme ignore este sitio y utilice el otro sitio como el sitio de empalme 5′. *b*) También se pueden reprimir o activar diferentes sitios de empalme de resistencia, dependiendo de la unión cercana de proteínas que tienden a activar sitios de empalme (proteínas SR) o reprimir sitios de empalme (proteínas hnRNP). Las proteínas SR se unen a sitios específicos dentro de exones o intrones llamados potenciadores de empalme de exones e intrones (ESEs, *exon splicing enhancers*, e ISEs, *intron splicing enhancers*) que se muestran en azul claro. Las proteínas hnRNP se unen a otros sitios en exones o intrones llamados silenciadores de empalme de exón e intrón (ESSs, *exon splicing silencers*, e ISSs, *intron splicing silencers*) que se muestran en rojo claro. La unión de estas proteínas puede regular la selección del sitio de empalme determinando si los componentes de empalme, tales como U2AF, snRNP U1 y snRNP U2, se unen a un sitio particular en el premRNA.

FUENTE: *a-b*) J Valcarcel, *et al*. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:377-386, fig. 2. Opinión actual en Cell Biology by Elsevier Ltd. Reproducido con permiso de Elsevier Ltd. en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

alrededor de 14 000 genes, lo que ilustra cómo el empalme alternativo puede permitir que un genoma relativamente pequeño codifique un proteoma mucho más grande.

La regulación del empalme alternativo, que permite a una neurona seleccionar una única isoforma *Dscam* y no otra, es compleja y un objetivo importante de la investigación en curso para todos los eventos de empalme alternativos. El mecanismo por el cual se incluye o excluye un exón particular depende principalmente de si la maquinaria de empalme selecciona los sitios de empalme específicos 3′ y 5′ como sitios para ser divididos (p. 425). Muchos factores pueden influir en la selección del sitio de empalme. Algunos sitios de empalme se describen como "débiles", lo que indica que la maquinaria de empalme puede evitarlos bajo ciertas condiciones. El reconocimiento y el uso de sitios de empalme débiles se rigen por secuencias en el RNA, que incluyen potenciadores de empalme exónico (p. 425), que se encuentran dentro de los exones cuya inclusión está regulada. Los potenciadores de empalme exónico sirven como sitios de unión para proteínas reguladoras específicas. Si una proteína reguladora particular está presente y activa en una célula determinada, esa proteína puede unirse al potenciador de empalme y reclutar los factores de empalme necesarios en un sitio de empalme débil 3′ o 5′ cercano. El uso de estos sitios de empalme da como resultado la inclusión del exón en el mRNA. En la **FIGURA 12-58** se muestra un modelo de cómo esto puede funcionar. Si la proteína reguladora no está presente y activa en la célula, los sitios de empalme vecinos no se reconocen y el exón se divide junto con los intrones flanqueantes.

Otra forma en que la expresión genética puede regularse a nivel postranscripcional es mediante la **edición de RNA**, en la que los nucleótidos específicos se convierten en otros nucleótidos, después de que se ha transcrito el RNA. La edición de RNA puede crear nuevos sitios de empalme, generar codones de parada o llevar a sustituciones de aminoácidos. Aunque no está tan extendido como el empalme alternativo, la edición de RNA es particularmente importante en el sistema nervioso, donde un número significativo de mensajes parece tener una o más adeninas (A) convertidas en inosinas (I). Esta modificación implica la eliminación enzimática de un grupo amino del nucleótido. A continuación, la máquina de traducción la lee como G. El receptor de glutamato, que media la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro (p. 164) es un producto de la edición de RNA. En este caso, una modificación de A a I genera un receptor de glutamato, cuyo canal interno es impermeable a los iones $Ca^{2+}$. Los ratones genéticamente modificados, que no pueden llevar a cabo este paso específico de edición de RNA, desarrollan convulsiones epilépticas graves y mueren a las pocas semanas después del nacimiento. Hay otro ejemplo importante de edición de RNA que afecta a la apolipoproteína B, una proteína transportadora de colesterol. Los complejos de LDL discutidos en la página 302 se producen en el hígado y contienen la proteína apolipoproteína B-100, que se traduce a partir de un mRNA de longitud completa de, aproximadamente, 14 000 nucleótidos de longitud. En el intestino, la citidina en el residuo de nucleótido 6666 en el RNA se convierte enzimáticamente en una uridina, que genera un codón de parada (UAA) que termina la traducción. La versión abreviada de la proteína, apolipoproteína B-48, se produce sólo en las células del intestino delgado, donde desempeña un papel esencial en la absorción de las grasas.

## REPASO

1. ¿Cómo es que el empalme alternativo puede aumentar eficazmente el número de genes en el genoma?
2. Describa un ejemplo de empalme alternativo. ¿Qué valor tiene para una célula este tipo de control? ¿Cómo podría una célula regular los sitios del premRNA que se eligen para el empalme?
3. ¿Qué es la edición de RNA y cómo puede aumentar la cantidad de proteínas que se pueden formar a partir de una sola transcripción de premRNA?

## 12.19 Control transduccional

Recuerde del Dogma Central que el DNA se usa para producir RNA y el RNA se usa para producir proteínas. Ya se ha visto en este capítulo que la expresión genética se controla ampliamente a nivel de la transcripción, pero la posterior traducción del mRNA en proteína proporciona una segunda etapa en la que se controla la expresión final de los genes en proteínas funcionales. El control transduccional abarca una amplia variedad de mecanismos reguladores que afectan la traducción de los mRNA previamente transportados desde el núcleo al citoplasma. Los temas considerados bajo este paraguas regulador general incluyen 1) localización del mRNA en ciertos sitios dentro de una célula, 2) si un mRNA se traduce y, de ser así, con qué frecuencia, y 3) la vida media del mRNA, una propiedad que determina cuánto tiempo se traduce el mensaje.

Los mecanismos de control transduccional generalmente operan a través de interacciones entre mRNA específicos y varias proteínas y microRNA presentes dentro del citoplasma. En la página 419, se analizó que los mRNA contienen regiones que no codifican, llamadas **regiones no traducidas (UTRs, *untranslated regions*)**, en sus extremos 5′ y 3′. La UTR 5′ se extiende desde el casquete 5′ hasta el codón de iniciación AUG, mientras que la UTR 3′ se extiende desde el codón de terminación hasta el final de la transcripción del RNA (véase figura 11-19). Durante muchos años, las regiones no traducidas del mensaje fueron ignoradas en gran medida, pero se ha vuelto evidente que las UTR contienen secuencias de nucleótidos utilizadas por la célula para mediar en el control de la traducción. En las células eucariotas, varios procesos biológicos importantes dependen de la traducción de mRNA almacenados que no se traducen inmediatamente después de la entrada al citoplasma. Como ejemplo, muchos mRNA se almacenan en óvulos no fertilizados que deben permanecer inactivos hasta la fertilización y el desarrollo posterior. El inicio de la traducción de estos mRNA durante el desarrollo temprano implica, al menos, dos eventos distintos: la eliminación de las proteínas inhibidoras unidas y el aumento de la longitud de las colas poli(A) por acción de una enzima que reside en el citoplasma del óvulo. Estos eventos se ilustran en el modelo de activación traduccional en embriones de *Xenopus* en la **FIGURA 12-59** y sirven para enfatizar el hecho de que los extremos 5′ y 3′ de los mRNA a menudo se comunican por interacción proteína-proteína, para regular la traducción.

### Iniciación de la traducción

Las células procariotas tienen mRNA policistrónicos que codifican numerosos polipéptidos, mientras que los mRNA eucariotas son predominantemente monocistrónicos y codifican sólo un único polipéptido. En ambos casos, la traducción comienza en un codón AUG, pero la forma en que el ribosoma encuentra este codón de inicio es completamente distinta y proporciona un medio para regular de manera diferencial la producción de proteínas. Comenzaremos con la iniciación de la traducción eucariota, ya que es bastante simple: el primer AUG corriente abajo del casquete 7-metilguanosina casi siempre es el codón de inicio. La pequeña subunidad del ribosoma se ensambla en la estructura del casquete y se escanea hacia abajo hasta que se encuentra el primer AUG, después de lo cual la gran subunidad del ribosoma se une y comienza la traducción (véase figura 11-47). Hay algunos ejemplos en los que un *sitio interno de entrada al ribosoma* (IRES, *internal ribosome entry site*) permite que el ribosoma comience en un AUG diferente del primero corriente abajo del casquete, pero la abrumadora mayoría de los mRNA están estructurados de manera que la traducción comienza en el primer AUG corriente abajo del casquete.

Se han descubierto varios mecanismos que regulan la velocidad de traducción de los mRNA en respuesta a los cambios en los requisitos de las células. Se puede considerar que algunos de estos mecanismos actúan globalmente, porque afectan la traducción de todos los mensajes. Cuando una célula humana se somete a ciertos estímulos estresantes, se activa una proteína cinasa que fosforila el factor de iniciación eIF2, que bloquea además la síntesis de proteínas. Como se discutió en la página 443, eIF2-GTP entrega el tRNA iniciador a la subunidad ribosómica pequeña, después de lo cual se convierte en eIF2-GDP y se libera. La versión fosforilada de eIF2 no puede intercambiar su GDP por GTP, que se requiere para que eIF2 participe en otra ronda de iniciación de la traducción. Es interesante observar que se han identificado cuatro proteínas cinasas diferentes que fosforilan el mismo residuo Ser de la subunidad eIF2$\alpha$, para desencadenar la inhibición de la traducción. Cada una de estas cinasas se activa después de un tipo diferente de estrés celular, que incluye el choque térmico, la infección viral, la presencia de proteínas desplegadas o la inanición de aminoácidos. Por tanto, al menos cuatro vías de estrés diferentes convergen para inducir la misma respuesta.

Otros mecanismos influyen en la velocidad de traducción de mRNA *específicos*, a través de la acción de proteínas que reconocen elementos específicos en las UTR de esos mRNA. Uno de los ejemplos mejor estudiados implica el mRNA que codifica la proteína ferritina. La ferritina secuestra los átomos de hierro en el citoplasma de las células, protegiendo así las células de los efectos tóxicos del exceso de metal libre. La traducción de mRNA de ferritina está regulada por un represor específico, denominado *proteína reguladora de hierro* (IRP, *iron regulatory protein*), cuya actividad depende de la concentración de hierro no unido en la célula.



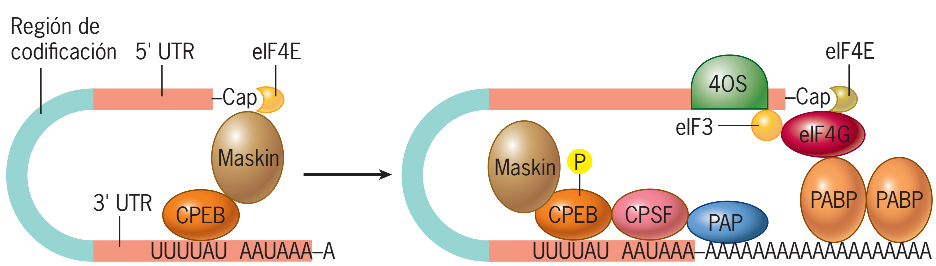



**FIGURA 12-59 Modelo para el mecanismo de activación traduccional de mRNA después de la fertilización de un óvulo de *Xenopus*.** Los RNA mensajeros aportados por la madre en el óvulo se mantienen en el citoplasma en un estado inactivo, mediante una combinación de sus colas cortas de poli(A) y una proteína inhibidora unida llamada Maskin. Maskin está anclada en una superficie a CPEB, una proteína que se une a las secuencias en la UTR 3′ de mRNA específicos, y en otra superficie, a la proteína de unión al casquete eIF4E. Después de la fertilización, CPEB se fosforila, lo que desplaza a Maskin. La versión fosforilada de CPEB recluta otra proteína CPSF, que recluta la poli(A) polimerasa (PAP, *poly(A) polymerase*), una enzima que agrega residuos de adenosina a la cola de poli(A). La cola poli(A) alargada sirve como un sitio de unión para moléculas PABP, que ayudan a reclutar eIF4G, un factor de iniciación requerido para la traducción. Como resultado de estos cambios, el mRNA se traduce activamente.

FUENTE: Tomado de RD Mendez y JD Richter. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2001;2:514, *copyright 2001, Nature Reviews Molecular Cell Biology* by Nature Publishing Group. Reproducido con el permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

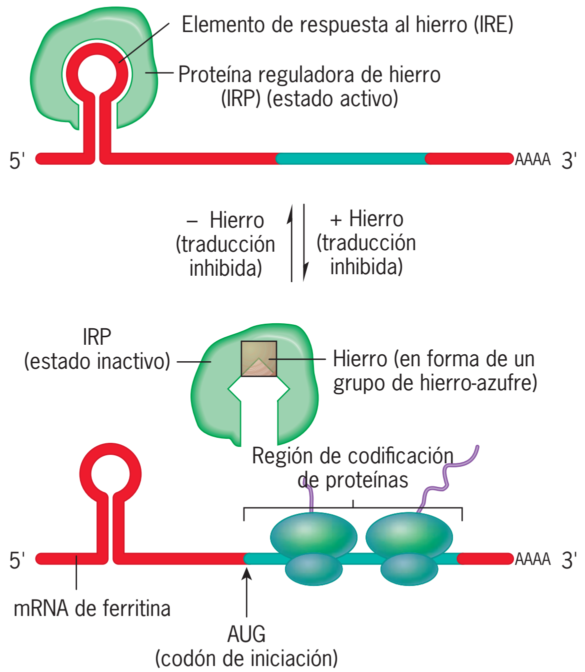



**FIGURA 12-60 Control en UTR 5′ de la traducción de mRNA de ferritina.** Cuando las concentraciones de hierro son bajas, una proteína represora de unión a hierro, llamada proteína reguladora de hierro (IRP), se une a una secuencia específica en la UTR 5′ del mRNA de ferritina, llamado elemento de respuesta al hierro (IRE), que se pliega en un asa de horquilla. Cuando el hierro está disponible, se une a la IRP, cambiando su conformación y haciendo que se disocie del IRE, lo que permite la traducción del mRNA para formar ferritina.

A bajas concentraciones de hierro, la IRP se une a una secuencia específica en la UTR 5′ del mRNA llamada *elemento de respuesta al hierro* (IRE, *iron-response element*) (**FIGURA 12-60**). La IRP unida interfiere físicamente con la unión de un ribosoma al extremo 5′ del mRNA, inhibiendo así la iniciación de la traducción. A altas concentraciones de hierro, la IRP se modifica de tal manera que pierde su afinidad por el IRE. La disociación de la IRP del mRNA de ferritina da acceso a la maquinaria traduccional al mRNA, y la proteína codificada se sintetiza.

Para los procariotas, el proceso de iniciación de la traducción es más complejo, porque hay múltiples codones de inicio en un mensaje policistrónico y los ribosomas deben encontrar los sitios de inicio correctos. Desde el punto de vista de la regulación, se podría predecir que todos los marcos de lectura abiertos en un mRNA policistrónico deberían traducirse a niveles iguales. Sin embargo, este no es el caso. El mecanismo utilizado para identificar codones de inicio auténticos es la presencia de una secuencia Shine-Dalgarno justo corriente arriba de los codones de inicio. Como se discutió en la página 442, esta secuencia es complementaria a una región en rRNA 16S dentro de la pequeña subunidad del ribosoma. El emparejamiento de bases entre la secuencia Shine-Dalgarno y el rRNA 16S coloca la subunidad pequeña justo corriente arriba de un codón de inicio que permite la entrada de la subunidad grande y el inicio de la traducción. Para algunos mRNA, la secuencia Shine-Dalgarno es perfectamente complementaria al rRNA 16S, y por tanto, la iniciación es muy eficiente. Para otros mRNA, la secuencia Shine-Dalgarno puede no ser exactamente complementaria al rRNA 16S, por lo que el inicio de la traducción será menos eficiente. De esta forma, se pueden regular las cantidades de proteína producidas a partir de cada marco de lectura abierto dentro de un mRNA policistrónico. Por ejemplo, tal vez la enzima A en el operón *trp* se necesita a niveles mucho más altos que las otras cuatro. Una secuencia Shine-Dalgarno perfecta corriente arriba del codón de inicio para la enzima A y el emparejamiento imperfecto para las otras cuatro permitiría una iniciación más eficiente para este marco de lectura abierto, en comparación con los otros.

## Localización citoplasmática de mRNA

En las células eucariotas, la localización de mRNA específicos en regiones citoplasmáticas específicas es un mecanismo muy utilizado, mediante el cual las células establecen dominios citoplásmicos distintos, desde el punto de vista de la función. Las recientes innovaciones en las técnicas de imagen de células vivas están permitiendo a los investigadores seguir los movimientos de los mRNA específicos fuera del núcleo y a través del citoplasma. Consideraremos brevemente la mosca de la fruta, cuyas fases de huevo, larva y adulto se ilustran en la figura 12-61*a*). El desarrollo del eje anterior-posterior (cabeza-abdomen) de una larva de la mosca y de un adulto posterior se prefigura por la localización de mRNA específicos, a lo largo de este mismo eje, en el ovocito. Por ejemplo, los mRNA transcritos durante la ovogénesis del gen *bicoid* se localizan preferentemente en el extremo anterior del ovocito, mientras que los mRNA transcritos del gen *oskar* se localizan en el extremo opuesto (**FIGURA 12-61*b*,*c***). Los mRNA se traducen luego en el sitio de localización, donde se acumula la proteína recién sintetizada. La proteína codificada por el mRNA *bicoid* desempeña un papel crucial en el desarrollo de la cabeza y el tórax, mientras que la proteína codificada por el mRNA *oskar* es necesaria para la formación de células germinales, que se desarrollan en el extremo posterior de la larva.

La información que rige la localización citoplasmática de estos mRNA reside en la UTR 3′. Esto se puede demostrar usando moscas de la fruta que portan un gen extraño, cuya región de codificación está fusionada a una secuencia de DNA que contiene la UTR 3′ del mRNA *bicoid* u *oskar*. Cuando el gen extraño se transcribe durante la ovogénesis, el mRNA se localiza en el sitio determinado por la UTR 3′. La localización de mRNA está mediada por proteínas de unión a RNA que reconocen secuencias de localización (denominadas *códigos postales*) en esta región del mRNA.

Los microtúbulos y las proteínas motoras que los utilizan como pistas desempeñan un papel clave en el transporte de partículas que contienen mRNA a lugares específicos. La localización de los mRNA *oskar* en un ovocito de la mosca de la fruta, por ejemplo, se ve alterada por agentes tales como la colchicina, que despolimeriza los microtúbulos, y por mutaciones que alteran la actividad de la proteína motora de la cinesina I. Por otra parte, se cree que los microfilamentos anclan mRNA una vez que han llegado a su destino. Durante el proceso de localización, la traducción de los mRNA se inhibe específicamente por las proteínas asociadas.

La localización de mRNA no está restringida a óvulos y ovocitos, sino que se produce en todos los tipos de células polarizadas. Por ejemplo, los mRNA de actina se localizan cerca del borde de ataque de un fibroblasto migratorio, que es el sitio donde se necesitan las moléculas de actina para la locomoción (figura 12-61*d*). Los estudios de grandes cantidades de genes sugieren que aproximadamente 70% de todos los mRNA está localizado en regiones específicas de la célula, lo que indica que la localización del mRNA puede tener un papel mucho más general en la regulación de la función genética de lo que se sospechaba antes.

## Control de la estabilidad del mRNA

Mientras más tiempo esté presente un mRNA en una célula, más veces puede servir como plantilla para la síntesis de un polipéptido. Si una célula debe controlar la expresión genética, es tan importante regular la supervivencia de un mRNA, como regular la síntesis de ese mRNA en primer lugar. A diferencia de los mRNA procariotas, que comienzan a degradarse en su extremo 5′, incluso antes de que se haya completado su extremo 3′, la mayoría de los mRNA eucariotas tienen una vida relativamente larga. Aun

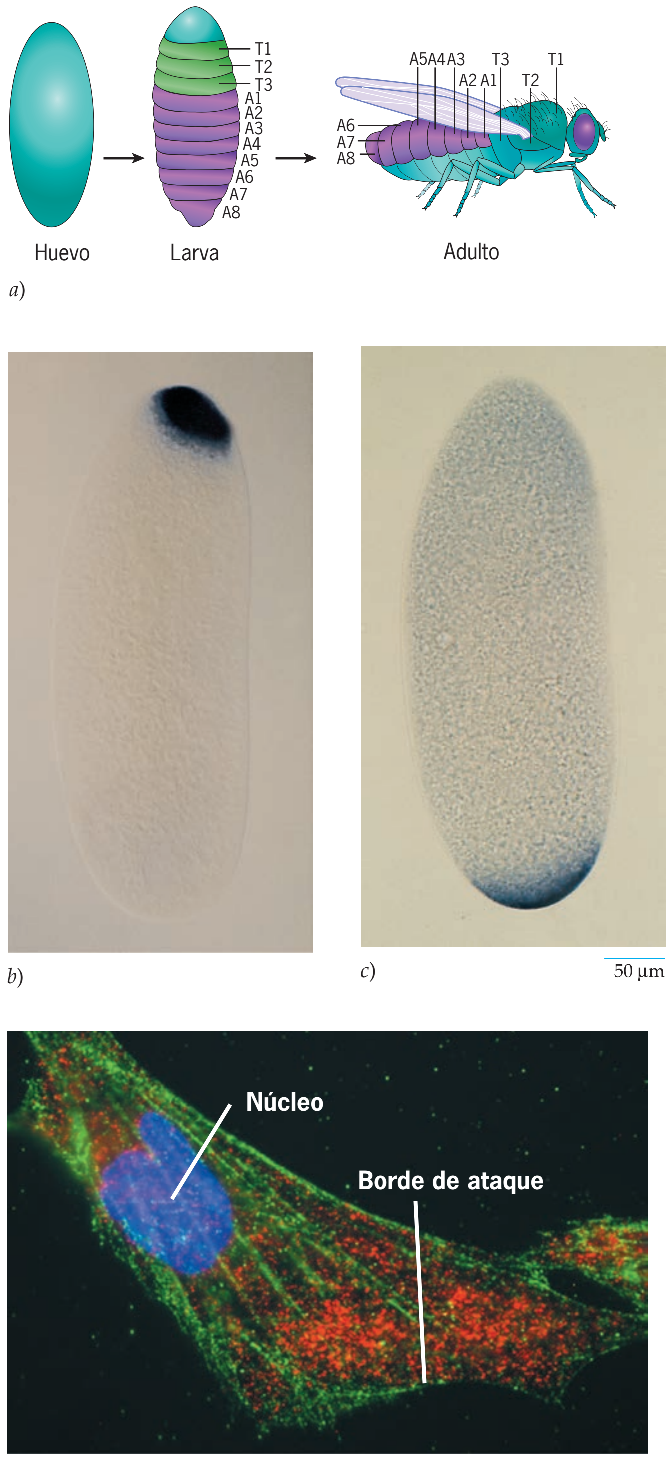



**FIGURA 12-61 Localización citoplasmática de mRNA.** *a*) Dibujos esquemáticos que muestran tres etapas en la vida de una mosca de la fruta: el huevo, la larva y el adulto. Se indican los segmentos del tórax y el abdomen. *b*) Localización de mRNA *bicoid* en el polo anterior de una etapa de división temprana de un embrión de mosca mediante hibridación *in situ*. *c*) Localización del mRNA *oskar* en el polo posterior de una etapa comparable a la que se muestra en *b*. Ambos RNA localizados desempeñan un papel importante en el desarrollo del eje anteroposterior de la mosca de la fruta. *d*) Localización de mRNA de β-actina (rojo) cerca del borde de ataque de un fibroblasto migratorio. Esta es la región de la célula donde se utiliza la actina durante la locomoción (véase figura 9-61).

FUENTE: *b*) Cortesía de Daniel St Johnston; *c*) Cortesía de Antoine Guichet y Anne Ephrussi, EMBL, Heidelberg, Alemania; d) Tomado de VM Latham, *et al*. Cortesía Robert H. Singer. *Curr Biol* 2001;11:1010, fig. 4d, con permiso de Elsevier.

así, la vida media de los mRNA eucariotas es bastante variable. El mRNA de *FOS*, por ejemplo, que participa en el control de la división celular, se degrada con rapidez (vida media de 10 a 30 minutos). En contraste, los mRNA que codifican la producción de las proteínas dominantes de una célula particular, como la hemoglobina en un precursor de eritrocitos o la ovoalbúmina en una célula del oviducto de una gallina, normalmente tienen vidas media de más de 24 horas. Por tanto, al igual que con la localización del mRNA o la velocidad de iniciación de la traducción del mRNA, la maquinaria reguladora de la célula puede reconocer los mRNA específicos y recibir un tratamiento diferencial.

A menos que estén protegidos por mecanismos como los que se usan en óvulos no fertilizados (p. 505), los mRNA con colas poli(A) cortas o ausentes se degradan rápidamente. Esto sugiere que la longevidad de un mRNA está relacionada con la longitud de su cola de poli(A). Cuando un mRNA típico sale del núcleo, contiene una cola de, aproximadamente, 200 residuos de adenosina (**FIGURA 12-62*a***, paso 1). Como un mRNA permanece en el citoplasma, su cola de poli(A) tiende a reducirse gradualmente en longitud, ya que es mordisqueada por un tipo de exonucleasa conocida como desadenilasa. No se observa ningún efecto drástico sobre la estabilidad del mRNA, hasta que la cola se acorta a cerca de 30 residuos (paso 2). Una vez que la cola se acorta a esta longitud, el mRNA, por lo general, se degrada rápidamente por cualquiera de las dos vías. En una de estas vías (mostrada en la figura 12-62*a*), la degradación del mRNA comienza en su extremo 5′, después de la eliminación de la poli(A) restante en el extremo 3′ del mensaje. El hecho de que la cola de poli(A) en el extremo 3′ del mensaje proteja el casquete en el extremo 5′ de la molécula sugiere que los dos extremos del mRNA se mantienen en proximidad cercana (véase figura 11-45). Una vez que se retira la cola 3′ (paso 3, figura 12-62*a*), el mensaje se decapita (paso 4) y se degrada desde el extremo 5′ hacia el extremo 3′ (paso 5). La desadenilación, la descapsulación, y la degradación del 5′ → 3′ ocurre dentro de pequeños gránulos citoplasmáticos transitorios llamados **cuerpos P** (figura 12-62*c*). Además de destruir los mRNA "no deseados", los cuerpos P también pueden actuar como sitios donde los mRNA que ya no se traducen se almacenan temporalmente. En la vía de degradación de mRNA alternativa que se muestra en la figura 12-62*b*), la eliminación de la cola de poli(A) (paso 3a) es seguida por la digestión continua del mRNA desde su extremo 3′ (paso 4a). La digestión de los mRNA en la dirección 3′ → 5′ se lleva a cabo mediante una exonucleasa que forma parte de un complejo de exonucleasas 3′ → 5′ llamado *exosoma*.

Debe haber más para la longevidad del mRNA que simplemente la longitud de la cola de poli(A), ya que los mRNA que tienen vidas medias muy diferentes comienzan con una cola de tamaño similar. Una vez más, se ha demostrado que las diferencias en la secuencia de nucleótidos de la UTR 3′ tiene un papel en la velocidad a la que se acorta la cola de poli(A). La UTR 3′ de un mRNA de globina, por ejemplo, contiene varias repeticiones de CCUCC que sirven como sitios de unión para proteínas específicas que estabilizan el mRNA. Si estas secuencias están mutadas, el mRNA se desestabiliza. Por el contrario, los mRNA de vida corta contienen, a menudo, elementos ricos en AU (p. ej., repeticiones de AUUUA) en su UTR 3′, que desestabilizan el mensaje. Si se introduce una de estas secuencias desestabilizadoras en la UTR 3′ de un gen de globina, la estabilidad del mRNA transcrito a partir del gen modificado se reduce de una vida media de 10 horas a una vida media de 90 minutos. La importancia de estas secuencias desestabilizadoras (y la inestabilidad general del mRNA que producen) puede apreciarse considerando el mRNA de *FOS*, normalmente de corta duración, mencionado con anterioridad. Si la secuencia desestabilizadora del gen *FOS* se pierde a través de una eliminación, la vida media del mRNA de *FOS* aumenta, y las células con frecuencia se vuelven malignas. Se cree que las secuencias desestabilizadoras en la UTR 3′ sirven como sitios de unión tanto para las proteínas (p. ej., AUF1), como

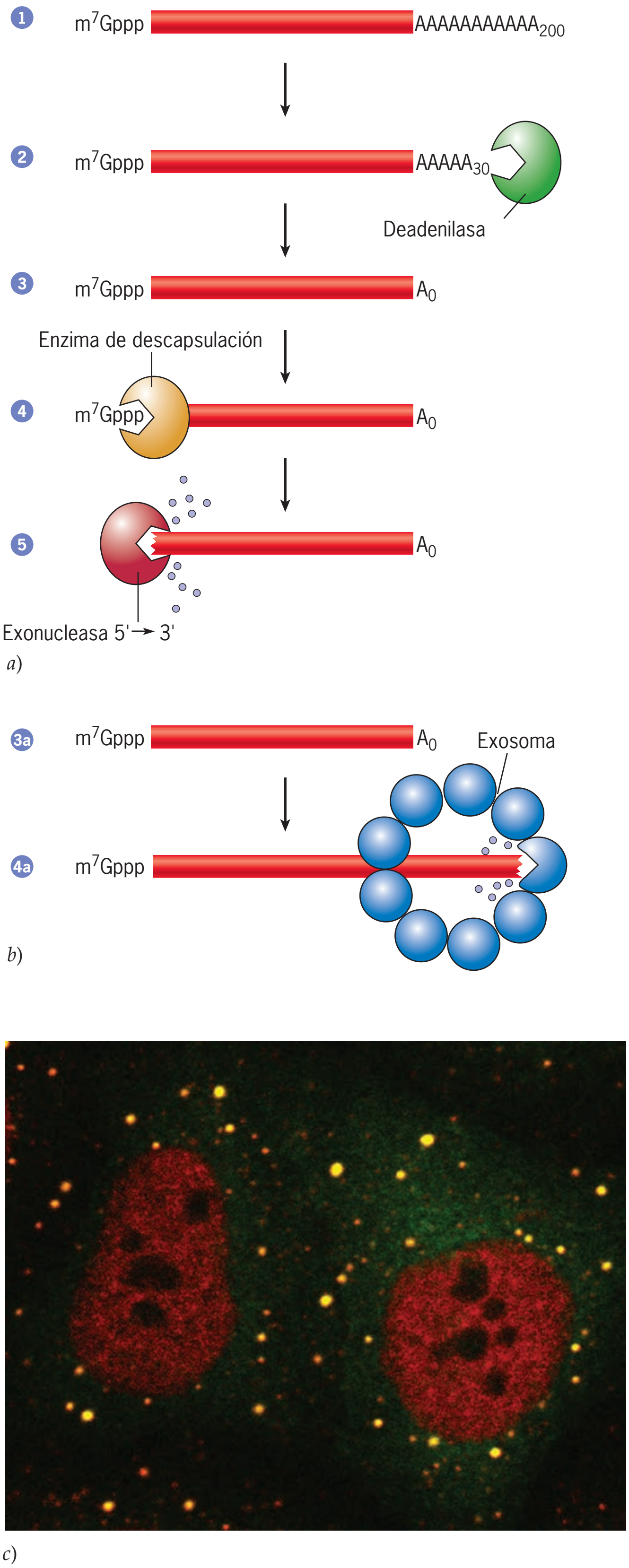



**FIGURA 12-62 Degradación del mRNA en células de mamíferos.** *a*, *b*) Los pasos descritos en estos dibujos se describen en el texto. *c*) Micrografía de fluorescencia que muestra los cuerpos P (amarillo) en el citoplasma de las células HeLa. Los cuerpos P se revelan como el sitio de localización de GFP-DCP1, una proteína involucrada en la descapsulación del mRNA. Los núcleos están en rojo.

FUENTE: c) Tomado de: F Tritschler, *et al. Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:380; recuadro 1. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd. Cortesía de D Lazaretti, Max Planck Institute, Tuebigen.

para los microRNA que provocan la desadenilación y posterior destrucción del mRNA, como se explica a continuación.

**REPASO**

1. Describa tres formas diferentes en las que la expresión genética puede ser controlada en el nivel de traducción. Cite un ejemplo de cada uno de estos mecanismos de control.
2. ¿Cuál es el papel de poli(A) en la estabilidad del mRNA? ¿Cómo podría la célula regular la estabilidad de diferentes mRNA?
3. Describa los diferentes niveles a los que se regula la expresión genética, para permitir que un gen de la globina β con la siguiente estructura dirija la formación de una proteína que represente más de 95% de la proteína de la célula.

exón 1—intrón—exón 2—intrón—exón 3

## 12-20 Papel de los microRNA en el control transduccional

Las proteínas no son las únicas moléculas que pueden actuar como reguladores de la traducción y estabilidad del mRNA. La formación y el mecanismo de acción de los microRNA se discutió en el capítulo 11 (p. 434). Como la mayoría de las proteínas que se han estado analizando, que regulan la traducción y estabilidad del mRNA, los miRNA actúan principalmente uniéndose a sitios en la UTR 3′ de sus mRNA blanco. Cada vez es más evidente que los miRNA son importantes reguladores de casi todos los procesos biológicos. Incluso las primeras etapas de desarrollo embrionario requieren la participación de miRNA, como lo demuestra el hecho de que los animales que carecen de la enzima que produce miRNA Dicer no se desarrollan más allá de la gastrulación. De manera similar, cuando Dicer sólo está ausente de un tejido en particular, el desarrollo de las células de ese tejido muestra anormalidades obvias. También se está haciendo evidente que las anomalías en los niveles de miRNA tienen un papel importante en el desarrollo de muchas enfermedades comunes.

Se cree que los microRNA ejercen su actividad reguladora mediante múltiples mecanismos, como se representa en la **FIGURA 12-63**.

1. El trabajo más reciente respalda un modelo que se descubrió por primera vez en embriones de peces cebra, que demostró que *miR-430* funcionaba para eliminar embriones de mRNA maternos, al inducir la desadenilación y la descomposición. En este modelo, el emparejamiento de miRNA recluta exonucleasas en el extremo 3′ de un mRNA blanco, dando como resultado un acortamiento de la cola de poli(A), seguido de degradación. Como se discutió en la página 505, muchos mRNA maternos se almacenan para su uso mientras los embriones se desarrollan, pero a medida que esos embriones comienzan a transcribir sus propios genomas, los mRNA maternos se destruyen activamente. El *miR-430* es abundante en extremo durante esta transición en embriones de pez cebra, y este miRNA se une a cientos de mRNA, lo que acelera su descomposición. Desde entonces, este mecanismo de degradación del mRNA mediado por miRNA ha sido demostrado en numerosos otros organismos, incluidos ratones y humanos, y es especialmente frecuente en células vegetales. La aparición generalizada de esta vía de degradación de mRNA se revela mejor al comparar los números de mRNA particulares en células en diferentes condiciones. En general, se encuentra que los niveles de mRNA se correlacionan de manera inversa con los niveles de miRNA complementarios. En otras palabras, cuando se introduce un miRNA particular en una población de células, los mRNA que poseen sitios de unión para ese

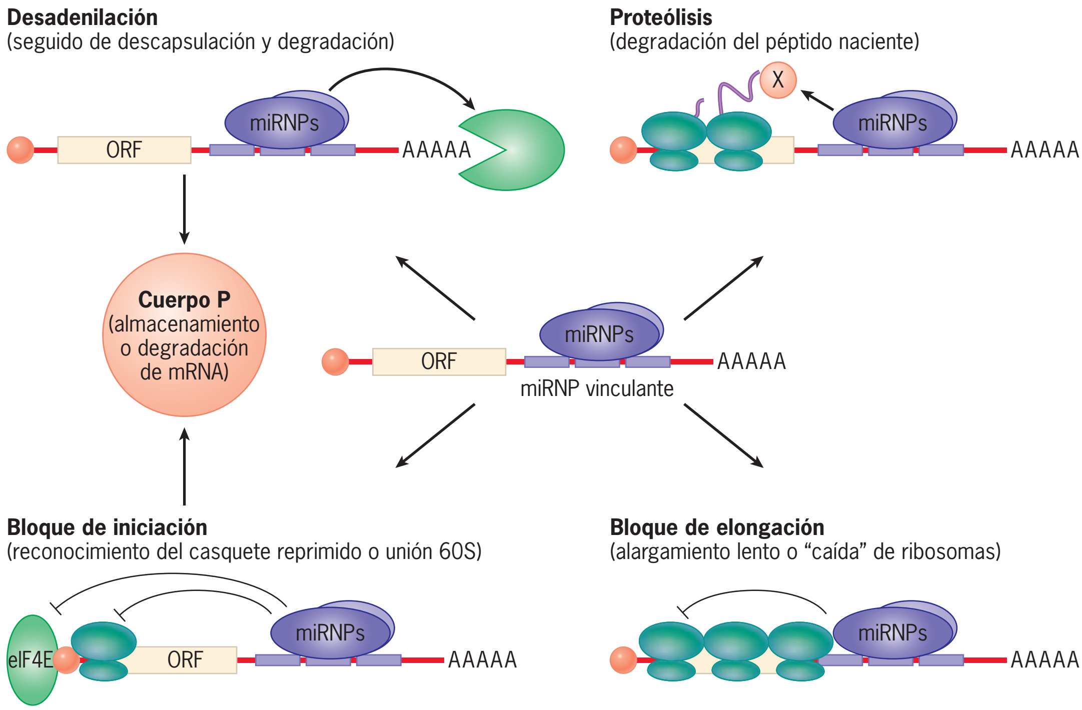



**FIGURA 12-63 Silenciamiento genético mediado por miRNA.** Los miRNA, como parte de un complejo de proteína miRNP como se ilustra en la figura 11-35, se emparejan con los elementos de secuencia en la UTR 3′ de los mRNA blanco. Reprimen la expresión genética después de la transcripción al promover la desadenilación y la degradación del mRNA (arriba a la izquierda), inhibiendo la iniciación de la traducción (inferior izquierda), inhibiendo el alargamiento de la traducción (abajo a la derecha) o, posiblemente, activando la degradación de péptidos nacientes (arriba a la derecha). Algunos mRNA: los pares de miRNA pueden almacenarse en los cuerpos P citoplasmáticos y, tras la depresión mediante la eliminación de miRNA, salir de los cuerpos P y reanudar la traducción. El marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) corresponde al segmento de codificación de aminoácidos del mRNA.

FUENTE: W Filipowicz, *et al. Nat Revs Gen* 2008;9:109, fig. 3. *Nature Reviews Genetics* by Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

miRNA disminuyen en número. Por el contrario, cuando los números de un miRNA particular se agotan experimentalmente, la abundancia de mRNA con sitios de unión para ese miRNA aumenta al mismo tiempo.

2. Un cuerpo de evidencia también sugiere que los miRNA pueden actuar inhibiendo la traducción de mRNA. La mayoría de las pruebas apuntan a miRNA que actúa en el paso donde se inicia la traducción, pero también pueden actuar para bloquear el alargamiento de la traducción.
3. Varios estudios preliminares sugieren que los miRNA pueden reclutar proteasas que degraden las proteínas nacientes durante la traducción.

Además de desempeñar un papel importante en la regulación general de los genes, los miRNA también parecen ser importantes mediadores de las respuestas al estrés. Una forma en que los miRNA podrían facilitar una respuesta rápida al estrés es bloqueando la traducción de mRNA específicos y manteniendo esos mRNA en su lugar, hasta que algún indicio o estrés externo libere la inhibición y permita que se reanude la traducción. En este modelo, los mRNA reprimidos se mantienen en cuerpos P citoplasmáticos y, bajo condiciones específicas, salen del cuerpo P y reanudan la traducción (figura 12-63).

### REPASO

1. Describa algunas de las formas en que los miRNA podrían regular la expresión genética.

## 12.21 Control postransduccional: determinación de la estabilidad de la proteína

Se ha visto cómo las células poseen mecanismos elaborados para controlar las velocidades a las que se sintetizan las proteínas. No es de extrañar que las células también posean mecanismos para controlar el tiempo que las proteínas específicas sobreviven, una vez que son completamente funcionales. Aunque el tema de la estabilidad proteica no cae, desde el punto de vista técnico, bajo el título de control de la expresión genética, es una extensión lógica de ese tema. Los estudios pioneros en el área de la degradación proteica selectiva fueron llevados a cabo por Avram Hershko y Aaron Ciechan, en Israel, e Irwin Rose y Alexander Varshavsky, en Estados Unidos.

La degradación de las proteínas celulares se lleva a cabo dentro de máquinas huecas, cilíndricas, que degradan las proteínas, llamadas **proteasomas**, las cuales se encuentran tanto en el núcleo como en el citosol de las células. Los proteasomas constan de cuatro anillos de subunidades polipeptídicas apiladas una encima de la otra con un casquete unido en cada extremo de la pila (**FIGURA 12-64*a,b***). Los dos anillos centrales consisten en polipéptidos (subunidades β) que funcionan como enzimas proteolíticas. Los sitios activos de estas subunidades se enfrentan a la cámara central cerrada, donde la digestión proteolítica puede ocurrir en un entorno protegido.

Los proteosomas digieren proteínas que han sido específicamente seleccionadas y marcadas para su destrucción, como se describe a continuación. Algunas proteínas se seleccionan, porque se reconocen como anormales, ya sea que están mal plegadas

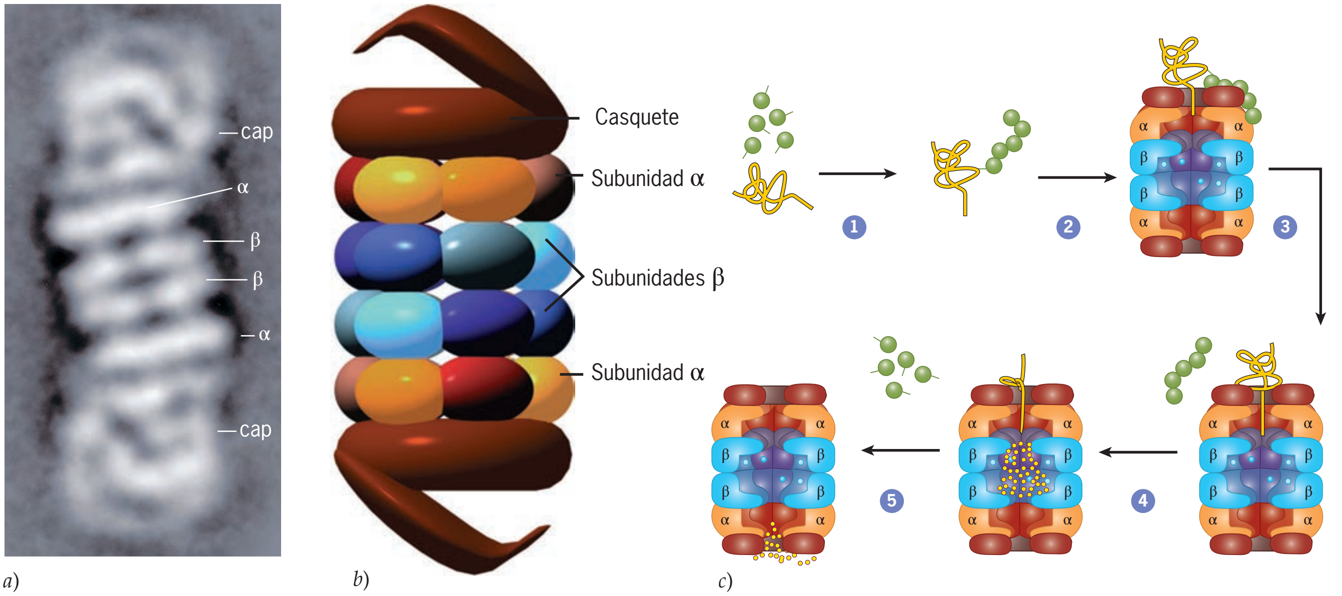



**FIGURA 12-64 Estructura y función del proteosoma.** *a*) Micrografía electrónica de alta resolución de un proteosoma aislado de *Drosophila*. *b*) Modelo de un proteosoma basado en microscopía electrónica de alta resolución y cristalografía de rayos X. Cada proteosoma consta de dos casquetes multisubunidades (o partículas reguladoras) en cada extremo de un cilindro en forma de túnel (o partícula nuclear) que está formado por una pila de cuatro anillos. Cada anillo consta de siete subunidades que se dividen en dos clases, tipo α y tipo β. Los dos anillos internos están compuestos de subunidades β, que rodean una cámara central. Las subunidades se dibujan en diferentes tonos de color, porque son polipéptidos similares, pero no idénticos. Tres de las siete subunidades β en cada anillo poseen actividad proteolítica; los otros cuatro están inactivos en las células eucariotas. Los dos anillos externos están compuestos por subunidades α enzimáticamente inactivas, que forman una abertura estrecha (alrededor de 13 Å), a través de la cual los sustratos polipeptídicos desplegados se enhebran para alcanzar la cámara central, donde se degradan. *c*) Pasos en la degradación de proteínas por un proteosoma. En el paso 1, la proteína a ser degradada se une covalentemente a una cadena de moléculas de ubiquitina. La unión de ubiquitina requiere la participación de tres enzimas distintas (E1, E2 y E3) en un proceso que no se describe en el texto. En el paso 2, la proteína blanco poliubiquitinada se une al casquete del proteosoma. La cadena de ubiquitina es luego eliminada, y el polipéptido desplegado se enhebra en la cámara central del proteosoma (paso 3), donde se degrada por la actividad catalítica de las subunidades β (pasos 4 y 5).

FUENTE: *a*) Cortesía H Holzl y Wolfgang Baumeister. *J Cell Biol* 2000;150:126. Reproducido con permiso de la Rockefeller University Press.

o incorrectamente asociadas con otras proteínas. Se incluyen en este grupo las proteínas anormales que se habían producido en los ribosomas unidos a la membrana del ER rugoso (p. 265). La selección de proteínas "normales" para la destrucción del proteasoma se basa en la estabilidad biológica de la proteína. Se cree que cada proteína tiene una longevidad o una vida media característica. Algunas moléculas de proteínas, como las enzimas de la glucólisis o las moléculas de globina de un eritrocito, están presentes durante días o semanas. Otras proteínas que se requieren para una actividad específica y fugaz, como las proteínas reguladoras que inician la replicación del DNA o desencadenan la división celular, pueden sobrevivir sólo unos pocos minutos. La destrucción de tales proteínas reguladoras clave por los proteosomas tiene un papel crucial en la progresión de los procesos celulares (como se ilustra en la figura 14-26). Velcade, un medicamento que inhibe específicamente la digestión proteosómica, ha sido aprobado para el tratamiento de algunas formas de cáncer.

No se conocen bien los factores que controlan la vida de una proteína. Uno de los determinantes es el aminoácido específico que reside en el extremo N de una cadena polipeptídica. Los polipéptidos que terminan en arginina o lisina, por ejemplo, por lo general son de vida corta. Varias proteínas que actúan en momentos específicos dentro del ciclo celular están marcadas para su destrucción cuando ciertos residuos se fosforilan. Sin embargo, otras proteínas llevan una secuencia interna específica de aminoácidos llamada *degron,* que asegura que no sobrevivan mucho tiempo dentro de la célula.

La **ubiquitina** es una proteína pequeña, altamente conservada, con varias funciones en diversos procesos celulares. En la página 300, por ejemplo, se vio que las proteínas de membrana que llevan una única molécula de ubiquitina unida se incorporan selectivamente a las vesículas endocíticas. Una sola ubiquitina unida funciona sobre todo como una señal de clasificación. Por el contrario, las proteínas se dirigen a la destrucción mediante la unión de una cadena de poliubiquitina, que consiste en múltiples moléculas de ubiquitina unidas covalentemente entre sí (paso 1, figura 12-64*c*). En la primera etapa de este proceso, la ubiquitina se transfiere de manera enzimática de una proteína transportadora a un residuo de lisina en la proteína condenada. Las enzimas que transfieren ubiquitina a las proteínas blanco comprenden una gran familia de *ubiquitina ligasa*, en la que diferentes miembros reconocen proteínas que portan distintas señales de degradación. Estas enzimas desempeñan un papel importante en la determinación de la vida o la muerte de las proteínas clave y son un tema de investigación actual.

Una vez que es poliubiquitinada, una proteína es reconocida por el casquete del proteosoma (paso 2, figura 12-64*c*), que elimina la cadena de poliubiquitina y despliega la proteína objetivo utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis de ATP. El polipéptido lineal desplegado se enhebra a continuación a través de la estrecha abertura en el anillo de las subunidades α y se pasa a la cámara central del proteosoma (paso 3), donde se digiere en pequeños péptidos (pasos 4 y 5). Los productos peptídicos se liberan de nuevo en el citosol, donde se degradan en sus aminoácidos componentes.

## REPASO

1. ¿Cuáles son los diferentes roles de una sola ubiquitina *versus* ubiquitinas múltiples cuando se une a una proteína blanco?

# Preguntas analíticas

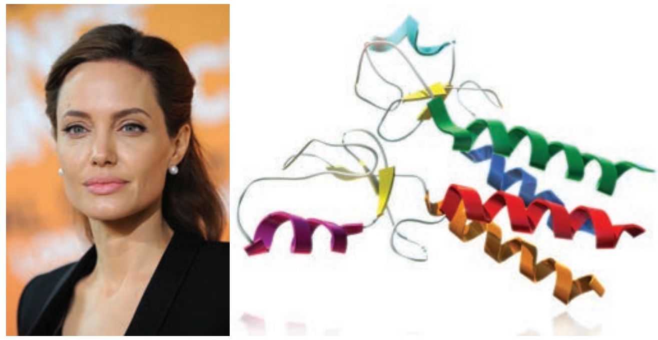


1. La metilación de K9 de la histona H3 (por una enzima SUV39H1) está asociada con la heterocromatinización y el silenciamiento genético. Se ha informado que la metilación de H3 por otras enzimas puede conducir a la activación transcripcional. ¿Cómo puede la metilación conducir a efectos opuestos?
2. ¿Cuántas copias de cada tipo de histona nuclear se necesitarían para envolver todo el genoma humano en los nucleosomas? ¿Cómo ha resuelto la evolución el problema de producir un número tan grande de proteínas en un periodo relativamente corto?
3. Suponga que descubrió un mutante sensible a la temperatura, cuyo núcleo no pudo acumular ciertas proteínas nucleares a una temperatura elevada (restrictiva), pero continuó acumulando otras proteínas nucleares. ¿Qué conclusiones puede extraer sobre la localización nuclear y la naturaleza de esta mutación?
4. Los humanos que nacen con tres cromosomas X, pero que no tienen cromosomas Y, a menudo se convierten en mujeres de apariencia normal. ¿Cuántos cuerpos de Barr espera que tengan las células de estas mujeres? ¿Por qué?
5. Suponga que la desactivación de X no es un proceso aleatorio, sino que siempre conduce a la inactivación del cromosoma X derivado del padre. ¿Qué efecto esperaría que esto tuviese en el fenotipo de las mujeres?
6. Los cromosomas que se muestran en la figura 12-22*b*) se marcaron incubando la preparación con fragmentos de DNA que se sabe que son específicos para cada uno de los cromosomas. Suponga que uno de los cromosomas en el campo contiene regiones que tienen dos colores diferentes. ¿Qué se podría concluir sobre este cromosoma?
7. ¿Qué ventaja podría obtenerse al sintetizar y procesar las transcripciones en ciertas regiones del núcleo, en lugar de, aleatoriamente, en todo el nucleoplasma? (Véase **video tutorial cuantitativo**).
8. Compare y contraste el efecto de una eliminación en el operador del operón de lactosa con uno en el operador del operón triptófano.
9. Si tuviera que encontrar un mutante de *E. coli* que produjera cadenas polipeptídicas continuas que contuvieran tanto β-galactosidasa como galactosidasa permeasa (codificada por el gen y), ¿cómo podría explicar cómo sucedió esto?
10. Se sospecha que una nueva hormona que se está probando funciona para estimular la síntesis de miosina, al actuar a nivel transcripcional. ¿Qué tipo de evidencia experimental apoyaría esta afirmación?
11. Suponga que ha llevado a cabo una serie de experimentos en los que ha trasplantado núcleos de varios tejidos adultos diferentes a un óvulo de ratón activado y enucleado, y ha descubierto que el óvulo no se desarrolló más allá de la etapa de blastocito. ¿Podría concluir que el núcleo trasplantado había perdido los genes necesarios para el desarrollo posblástula? ¿Por qué sí o por qué no? ¿Qué le dice este tipo de experimento de forma más general sobre la interpretación de resultados negativos?
12. Se observó en la página 493 que la huella de DNA permite el aislamiento de secuencias de DNA que se unen a factores de transcripción específicos. Describa un protocolo experimental para identificar factores de transcripción que se unen a una secuencia de DNA aislada. (Puede considerar las técnicas discutidas en la sección 18.11.)
13. ¿Cómo explica por qué los potenciadores pueden moverse dentro del DNA sin afectar su actividad, mientras que la caja TATA sólo funciona en un sitio específico?
14. Suponga que está trabajando con una célula que presenta un nivel muy bajo de síntesis de proteínas y sospecha que las células están sujetas a un inhibidor de control de la traducción global. ¿Qué experimento podría realizar para determinar si este es el caso?
15. Las secuencias de señal que dirigen la translocación de proteínas hacia el retículo endoplasmático son escindidas por una señal peptidasa, mientras que las NLS y las NES requeridas para el movimiento de una proteína dentro o fuera del núcleo permanecen como parte de esa proteína. Considere una proteína como hnRNPA1, que está involucrada en la exportación de mRNA al citoplasma. ¿Por qué es importante que las secuencias de señal de transporte para esta proteína permanezcan como parte de la proteína, mientras que la secuencia de señal para las proteínas ER puede escindirse?
16. Cuando el DNA metilado se introduce en células de mamífero cultivadas, generalmente se transcribe durante un periodo antes de que se vuelva a reprimir. ¿Por qué esperaría este tipo de retraso antes de que ocurra la inhibición de la transcripción?
17. Suponga que ha aislado un nuevo factor de transcripción y desea saber qué genes podría regular esta proteína. ¿Hay alguna manera de que pueda usar una micromatriz de cDNA del tipo que se muestra en la figura 12-35 para abordar esta pregunta? (*Nota*: la micromatriz de la figura 12-35 contiene el DNA de las regiones que codifican proteínas, a diferencia de la de la figura 12-46.)
18. Aunque se han clonado varias especies diferentes de mamíferos, la eficacia de este proceso es extremadamente baja. A menudo, decenas o incluso cientos de ovocitos deben ser implantados con núcleos de donantes para obtener un nacimiento vivo sano. Muchos investigadores creen que las dificultades con la clonación residen en las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA y las histonas, que ocurren dentro de varias células durante la vida de un individuo. ¿Cómo sospecha que tales modificaciones podrían afectar el éxito de un experimento como el que se muestra en la figura 12-32?
19. Un estudio en una revista médica británica descubrió que había una correlación en la longitud de los telómeros entre los padres y sus hijas y entre las madres y sus hijos e hijas, pero no entre los padres y sus hijos. ¿Cómo puede explicar este hallazgo?
20. Algunos informes científicos se describen mejor como correlaciones, ya que informan sobre dos eventos o condiciones que tienden a acompañarse mutuamente. Las correlaciones a menudo se interpretan como evidencia de una relación causal entre los dos eventos o condiciones. Otros informes científicos implican una intervención experimental y generalmente hacen un caso más fuerte para una relación causal. Elija una conclusión científica que se exponga en este capítulo y que se base en ambos tipos de evidencia. ¿Qué tipo de informe le parece más convincente?

CAPÍTULO

# 13 Replicación y reparación de DNA

## PRUEBA *BRCA1* Y RIESGO DE CÁNCER DE MAMA



FUENTE: (izquierda) Eamonn M. McCormack/Getty Images, Inc.; (derecha) Evan Oto/Science Source Images

Cada vez que nuestras células se dividen, necesitan hacer una copia exacta de nuestro genoma. Los errores en la secuencia del genoma pueden iniciar a las células por el camino a convertirse en cáncer al mutar los genes que controlan la división celular. Por tanto, es fundamental que nuestro genoma se copie con precisión cuando las células se dividen y se repare cualquier daño en el DNA que pueda cambiar la secuencia de nuestro genoma. El daño al DNA puede ocurrir en respuesta a la luz del sol o la radiación, pero también puede ocurrir al azar sin ninguna causa externa. Sin importar la causa, nuestras células necesitan reparar el daño, y si no pueden, entonces nuestros genomas acumulan mutaciones o reordenamientos cromosómicos que pueden conducir directamente al cáncer. Las mujeres con alelos particulares del gen *BRCA1* involucrados en la reparación del DNA, tienen un riesgo de tres a siete veces mayor de desarrollar cáncer de mama (la abreviatura "BRCA" significa "cáncer de mama"). Este descubrimiento condujo a pruebas genéticas simples para las anomalías BRCA1, que proporcionan un sistema de alerta temprana para el alto riesgo de cáncer de mama. Pero esta prueba crea una situación en la que muchas personas descubren que tienen un riesgo elevado de cáncer de mama aunque en ese momento realmente no lo tengan. ¿Qué puede hacer alguien que descubre que está en riesgo? Un enfoque extremo es extirpar ambos senos quirúrgicamente, un método conocido como mastectomía preventiva. Este enfoque quirúrgico efectivamente reduce el riesgo de cáncer en 90% para pacientes en riesgo. Una opción menos invasiva es que los pacientes con anomalías genéticas BRCA1 se sometan a exámenes de detección más frecuentes para detectar cualquier tipo de cáncer que pueda desarrollarse, en una etapa más temprana y más tratable. A nivel de sociedad, todavía estamos aprendiendo la mejor forma de utilizar el diagnóstico genético de riesgo. Es una decisión compleja que cada individuo debe tomar por sí mismo, pero ayuda al público a comprender los problemas y riesgos. En el caso de las pruebas genéticas BRCA1, el problema fue dramáticamente expuesto al público por la actriz Angelina Jolie, que eligió someterse a una mastectomía preventiva después de descubrir que tenía una anomalía genética BRCA1. Puede leer sobre su decisión en un artículo que escribió para el *New York Times*: http://www.nytimes.com/2013/05/14/opinion/mymedicalchoice.html? _R = 2&. En este capítulo se discutirá cómo se replica el DNA con un alto nivel de precisión para evitar errores y cómo se reparan los errores o daños en nuestro DNA.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**13.1** Replicación de DNA
**13.2** Replicación de DNA en células bacterianas
**13.3** La maquinaria que opera en la horquilla de replicación
**13.4** Estructura y funciones de las DNA polimerasas
**13.5** Replicación en los virus
**13.6** Replicación del DNA en las células eucariotas
**13.7** Estructura y replicación de cromatina
**13.8** Reparación del DNA
**13.9** Entre la replicación y la reparación
**13.10** **PERSPECTIVA HUMANA:** Consecuencias de las deficiencias de reparación del DNA

## 13.1 Replicación de DNA

La reproducción es una propiedad fundamental de todos los sistemas vivos. El proceso de reproducción se puede observar en varios niveles: los organismos se duplican por reproducción asexual o sexual, las células se duplican por división celular y el material genético se duplica por la **replicación del DNA**. La maquinaria que replica el DNA también se llama a la acción en otra capacidad: reparar el material genético después de que ha sufrido daños. Estos dos procesos —la replicación del DNA y su reparación— son los temas que se abordan en este capítulo.

Se presume que la capacidad de autoduplicación fue una de las primeras propiedades críticas que apareció en la evolución de las primeras formas de vida primitiva. Sin la capacidad de propagarse, cualquier conjunto primitivo de moléculas biológicas estaría destinado al olvido. Los primeros portadores de información genética eran probablemente moléculas de RNA que podían autorreplicarse. A medida que progresó la evolución y las moléculas de RNA se reemplazaron por moléculas de DNA como material genético, el proceso de replicación se hizo más complejo y requirió una gran cantidad de componentes auxiliares. Por tanto, aunque una molécula de DNA contiene la información para su propia duplicación, carece de la capacidad de realizar la actividad en sí misma. Como lo expresó Richard Lewontin, "la imagen común del DNA como una molécula que se autorreplica es casi tan cierta como describir una carta como un documento autorreplicante. La carta necesita una fotocopiadora; el DNA necesita una célula". Se verá entonces cómo la célula lleva a cabo esta actividad.

La propuesta de Watson y Crick para la estructura del DNA en 1953 estuvo acompañada por un mecanismo sugerido para su "autoduplicación". Las dos hebras de doble hélice se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno entre las bases. Individualmente, estos enlaces de hidrógeno son débiles y se rompen fácilmente. Watson y Crick previeron que la replicación ocurrió por la separación gradual de las hebras de doble hélice (véase **FIGURA 13-1**), muy similar a la separación de dos mitades de una cremallera. Debido a que las dos hebras son complementarias entre sí, cada hebra contiene la información requerida para la construcción de la otra. Por tanto, una vez que las hebras se separan, cada una puede actuar como una plantilla para dirigir la síntesis de la hebra complementaria y restaurar el estado de doble hebra.

La propuesta de Watson-Crick mostrada en la figura 13-1 hizo ciertas predicciones sobre el comportamiento del DNA durante la replicación. De acuerdo con la propuesta, cada hija dúplex debe consistir en una hebra completa heredada del dúplex parental y una hebra complementaria completa recién sintetizada. Se dice que la replicación de este tipo (consúltese **FIGURA 13-2**, esquema 1) es **semiconservativa** porque cada hija dúplex contiene una hebra de la estructura parental. A falta de información sobre el mecanismo responsable de la replicación, se tuvieron que considerar otros dos tipos de replicación. En la replicación *conservativa* (véase figura 13-2, esquema 2), las dos hebras originales permanecerían juntas (después de servir como plantillas), al igual que las dos hebras recién sintetizadas. Como resultado, una de las hijas dúplex contendría solo DNA parental, mientras que la otra hija dúplex contendría solo DNA recién sintetizado. En la replicación *dispersiva* (obsérvese figura 13-2, esquema 3), las hebras parentales se dividirían en fragmentos, y las nuevas hebras se sintetizarían en segmentos cortos. Luego, los viejos fragmentos y los nuevos segmentos se unirían para formar una hebra completa. Como resultado, las hijas dúplex contendrían hebras compuestas por DNA viejo y nuevo. A primera vista, la replicación dispersativa podría parecer una solución improbable, pero a Max Delbrück le pareció en ese momento la única forma de evitar la tarea aparentemente imposible de desenrollar dos hebras entrelazadas de un DNA dúplex mientras se replicaba (discutido en la p. 517).

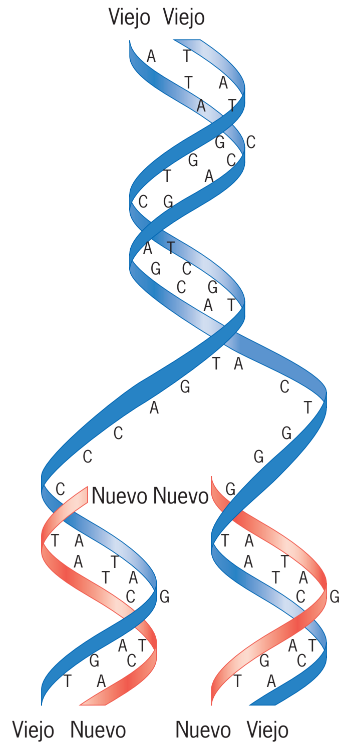



**FIGURA 13-1 Propuesta original de Watson-Crick para la replicación de una molécula de doble hélice de DNA.** Durante la replicación, la doble hélice se desenrolla, y cada una de las hebras parentales sirve como plantilla para la síntesis de una nueva hebra complementaria. Como se discute en este capítulo, estos principios básicos han sido confirmados.

Para decidir entre estas tres posibilidades, era necesario distinguir las hebras de DNA recién sintetizadas de las hebras de DNA originales que servían como plantillas. Esto se logró en estudios sobre bacterias en 1957 por Matthew Meselson y Franklin Stahl del Instituto de Tecnología de California, quienes usaron isótopos de nitrógeno pesados ($^{15}$N) y ligeros ($^{14}$N) para distinguir entre hebras de DNA parentales y recién sintetizadas (véase **FIGURA 13-3**). Estos investigadores cultivaron bacterias en un medio que contenía cloruro de amonio $^{15}$N como la única fuente de nitrógeno. En consecuencia, las bases que contienen nitrógeno del DNA de estas células contenían solo el isótopo pesado de nitrógeno. Los cultivos de bacterias "pesadas" se lavaron del medio antiguo y se incubaron en medio nuevo con compuestos ligeros que contenían $^{14}$N, y las muestras se eliminaron a intervalos crecientes durante un periodo de varias generaciones. El DNA se extrajo de las muestras de bacterias y se sometió a centrifugación en gradiente de densidad de equilibrio (véase figura 18-38). En este procedimiento, el DNA se mezcla con una solución concentrada de cloruro de cesio y se centrifuga hasta que las moléculas de DNA bicatenario alcanzan el equilibrio de acuerdo con su densidad.

En el experimento Meselson-Stahl, la densidad de una molécula de DNA es directamente proporcional al porcentaje de átomos $^{15}$N o $^{14}$N que contiene. Si la replicación es semiconservadora, cabría esperar que la densidad de las moléculas de DNA disminuya durante el cultivo en el medio que contiene $^{14}$N de la manera que se muestra en el conjunto superior de tubos de centrífuga de la figura 13-3*a*). Después de una generación, todas las moléculas de DNA serían híbridos $^{15}$N-$^{14}$N, y su densidad de flotación estaría a medio camino entre la esperada para el DNA totalmente pesado y el totalmente ligero (consúltese figura 13-3*a*). A medida que la replicación continuó más allá de la primera generación, las hebras recién sintetizadas continuarían conteniendo solo isótopos ligeros, y aparecerían dos tipos de dúplex en los

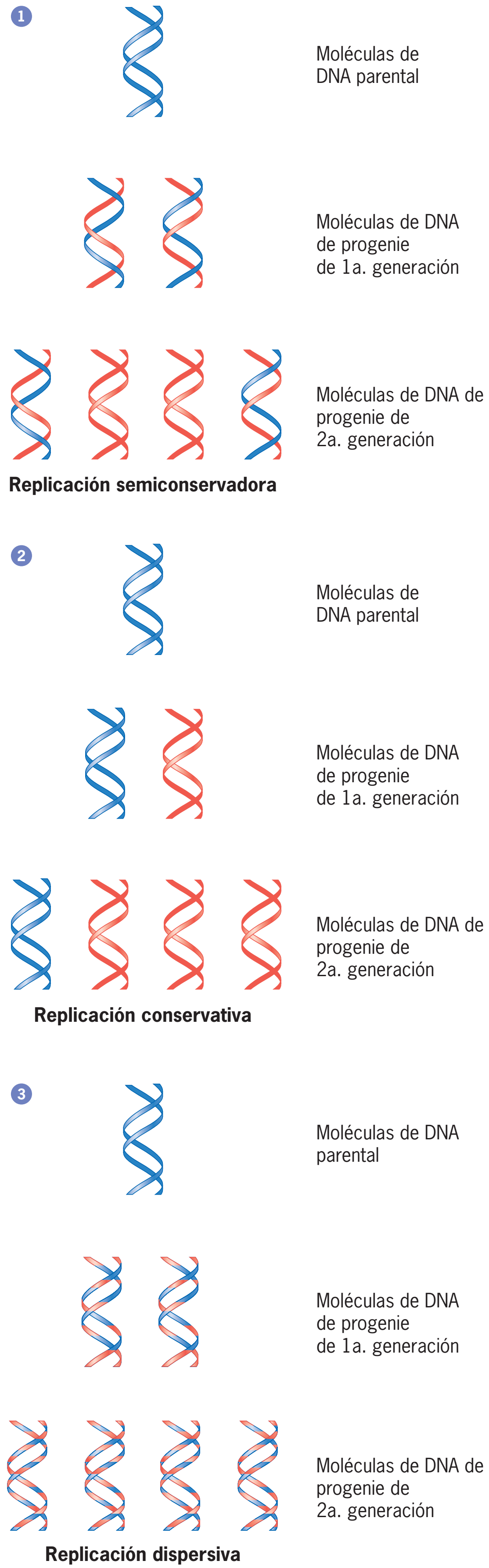



**FIGURA 13-2 Tres esquemas alternativos de replicación.** La replicación semiconservativa se representa en el esquema 1, la replicación conservativa en el esquema 2 y la replicación dispersiva en el 3. En el texto se brinda una descripción de los tres modos alternativos de replicación.

gradientes: los que contienen híbridos $^{15}N$-$^{14}N$ y los que contienen solo $^{14}N$. Como el tiempo del crecimiento en el medio ligero continuó, un porcentaje cada vez mayor de las moléculas de DNA presentes, sería ligero. Sin embargo, mientras la replicación continuó de forma semiconservativa, las hebras parentales pesadas originales permanecerían intactas y presentes en moléculas de DNA híbridas que ocupaban un porcentaje cada vez más pequeño del DNA total (consúltese figura 13-3*a*). Los resultados de los experimentos de gradiente de densidad obtenidos por Meselson y Stahl se muestran en la figura 13-3*b*), y demuestran inequívocamente que la replicación se produce de manera semiconservativa. Los resultados que se habrían obtenido si la replicación se hubiera producido por mecanismos conservativos o dispersivos se indican en los dos conjuntos inferiores de tubos de centrífuga de la figura 13-3*a*).[1]

Curiosamente, el experimento Meselson-Stahl tuvo éxito debido a un artefacto experimental fortuito. Los cultivos celulares utilizados en el experimento fueron asincrónicos, lo que significa que diferentes células comienzan la replicación del DNA en distintos momentos, de modo que cuando se hizo el cambio de medio de nitrógeno pesado a ligero, algunas de las células ya habían comenzado a replicar su DNA. El genoma de las células bacterianas es una sola molécula de DNA grande. Con comienzo con el DNA que contiene nitrógeno pesado, el DNA genómico replicante incorporará más y más nitrógeno ligero durante el experimento. Solo si el genoma se replica por completo en presencia de nitrógeno ligero, todo el DNA tendrá exactamente la densidad híbrida. En las células que ya habían comenzado a replicarse cuando se cambió el medio, las partes del genoma que ya se habían replicado seguirían siendo pesadas/pesadas, mientras que solo las partes del genoma que se replicaron después del cambio en el medio alcanzarían la densidad híbrida ligera/pesada. Esto significa que, si se midiera la densidad del genoma completo después de dar tiempo suficiente para replicar el genoma una vez, solo las células que acababan de comenzar la replicación cuando se cambiaba el medio tendrían genomas completamente ligeros/pesados. El resto tendría densidades intermedias porque parte de su genoma era ligero/pesado y parte pesado/pesado. Esto también sería cierto durante la siguiente ronda de replicación —el genoma aumentaría gradualmente en su densidad de ligero/pesado a ligero/ligero a medida que continúa la replicación del DNA—. Entonces, si Meselson y Stahl hubieran podido medir la densidad del DNA genómico intacto de la célula, lo que habrían visto era una muestra de densidades que comenzaba pesada/pesada y luego cambiaba continuamente a densidades cada vez más ligeras hasta que finalmente alcanzaban ligero/ligero. Esto se habría visto exactamente como el resultado predicho para la replicación dispersora (consúltese figura 13-3). Afortunadamente para Meselson y Stahl, estaban inadvertidamente rompiendo su DNA en pedazos pequeños cuando lo cargaban en la cámara de la centrífuga. Incluso si todo el genoma se está replicando gradualmente, una pequeña porción del genoma se replica o no, y por tanto sería pesada/pesada o pesada/ligera, lo que daría un aumento gradual de la etapa de limpieza en la densidad que era observada. Esto muestra que incluso los diseños experimentales más brillantes también pueden beneficiarse de un poco de buena suerte.

Durante el mismo periodo se demostró que la replicación se produce de forma semiconservativa también en eucariotas, mediante un enfoque experimental completamente diferente. Los

[1] Cualquier persona que busque explorar las circunstancias previas a este anunciado esfuerzo de investigación y examine los giros y vueltas experimentales a medida que se desarrollen podría querer leer el libro *Meselson, Stahl y la replicación del DNA* por Frederick Lawrence Holmes, 2001. Una discusión del experimento también se puede encontrar en *PNAS* 2004; 101:17889, que está en la web.

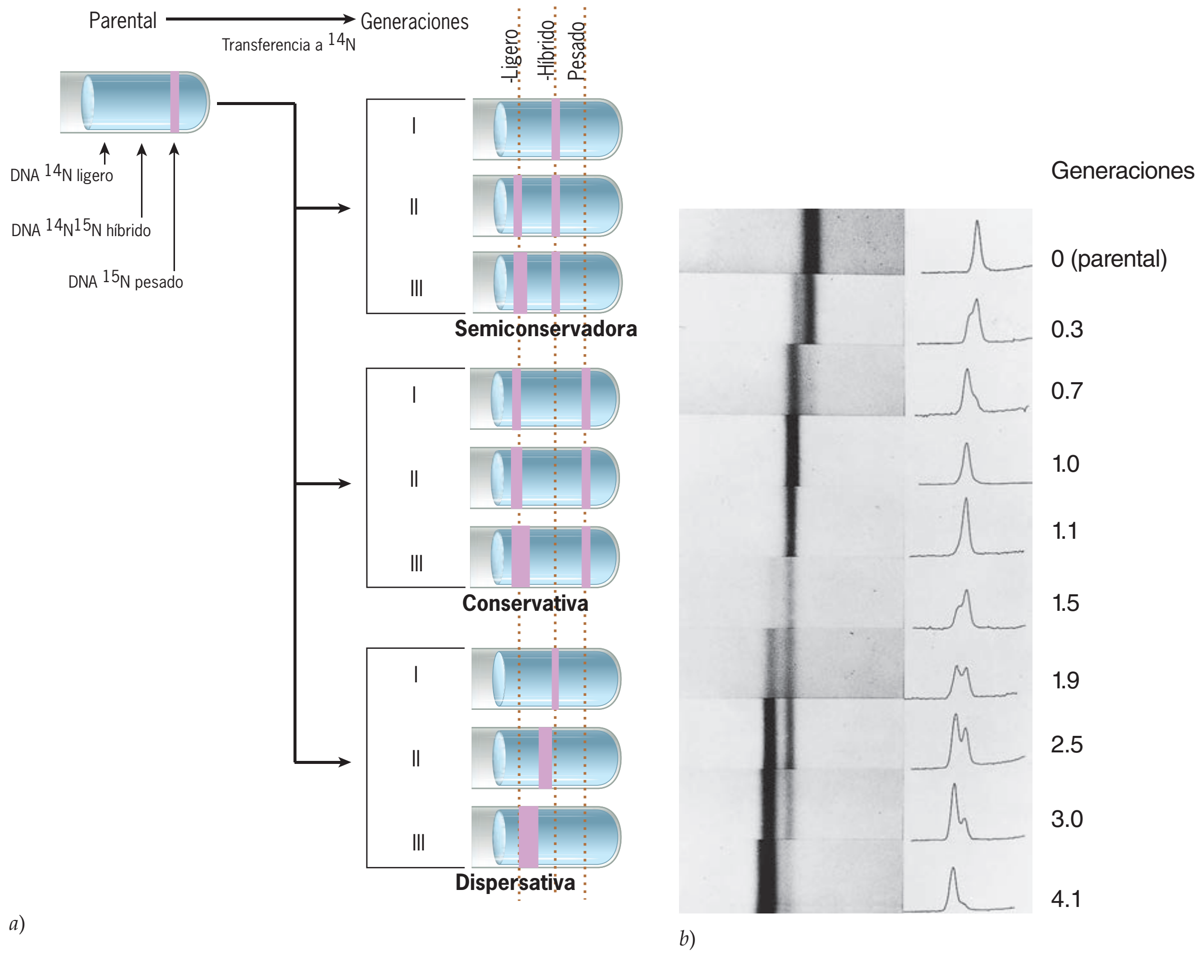



**FIGURA 13-3 Experimento que demuestra que la replicación del DNA en bacterias es semiconservativa.** El DNA se extrajo de las bacterias en diferentes etapas del experimento, se mezcló con una solución concentrada de la sal cloruro de cesio (CsCl, *cesium chloride*), se colocó en un tubo y se centrifugó para equilibrar a alta velocidad en una ultracentrífuga. Los iones cesio tienen suficiente masa atómica para que la fuerza centrífuga los afecte, y formen un gradiente de densidad durante el periodo de centrifugación con la concentración más baja (densidad más baja) de Cs en la parte superior del tubo y la mayor (densidad más alta) en el parte inferior. Durante la centrifugación, los fragmentos de DNA dentro del tubo se localizan en una posición que tiene una densidad igual a su propia densidad, que a su vez depende de la relación de $^{15}$N /$^{14}$N que está presente en sus nucleótidos. Cuanto mayor es el contenido de $^{14}$N, más alto en el tubo se encuentra el fragmento de DNA en equilibrio. *a*) Resultados esperados en este tipo de experimento para cada uno de los tres posibles esquemas de replicación. El único tubo a la izquierda indica la posición del DNA parental y las posiciones a las que bandean los fragmentos de DNA totalmente ligeros o híbridos. *b*) Resultados experimentales obtenidos por Meselson y Stahl. La aparición de una banda híbrida y la desaparición de la banda pesada después de una generación eliminan la replicación conservadora. La aparición posterior de dos bandas, una ligera y una híbrida, elimina el esquema dispersor.

FUENTE: *b*) Tomada de M. Meselson y F. Stahl. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1958;44:671. Cortesía de Matthew Meselson.

experimentos originales fueron llevados a cabo por J. Herbert Taylor, de la Universidad de Columbia, y de hecho fueron publicados más de un año antes de los estudios de Meselson y Stahl. El dibujo y la fotografía de la **FIGURA 13-4** muestran los resultados de un experimento más reciente en el que se permitió que las células cultivadas de mamífero experimentaran replicación en bromodesoxiuridina (BrdU, *bromodeoxyuridine*), un compuesto que se incorpora al DNA en lugar de la timidina. Después de la replicación, un cromosoma está formado por dos cromátidas. Después de una ronda de replicación en BrdU, ambas cromátidas de cada cromosoma contenían BrdU (obsérvese figura 13-4*a*). Después de dos rondas de replicación en BrdU, una cromátida de cada cromosoma estaba compuesta por dos hebras que contenían BrdU, mientras que la otra cromátida era un híbrido que consistía en una hebra conteniendo BrdU y otra conteniendo timidina (obsérvese figura 13-4*a, b*). La hebra que contiene timidina había sido parte de la molécula original de DNA parental antes de la adición de BrdU al cultivo. Es interesante considerar por qué Meselson y Stahl, que citan brevemente a Taylor en su documento emblemático, son tan ampliamente vistos como los primeros en demostrar la replicación semiconservativa a pesar del hecho de que Taylor ya había establecido este resultado un año antes. La razón más probable es que el enfoque de Meselson y Stahl probó la naturaleza molecular del DNA replicado más directamente que el enfoque microscópico de Taylor, y su ponencia hizo un mejor trabajo al ubicar los resultados en el contexto de la estructura de doble hélice del DNA.

## REPASO

1. La propuesta original de Watson-Crick para la replicación del DNA preveía la síntesis continua de hebras de DNA. ¿Cómo y por qué se ha modificado este concepto a lo largo de los años?
2. ¿Qué significa que la replicación es semiconservativa? ¿Cómo se demostró esta característica de replicación en las células bacterianas?, ¿en las células eucariotas?
3. ¿Por qué no hay bandas pesadas en los tres tubos superiores de la centrífuga de la figura 13-3*a*)?

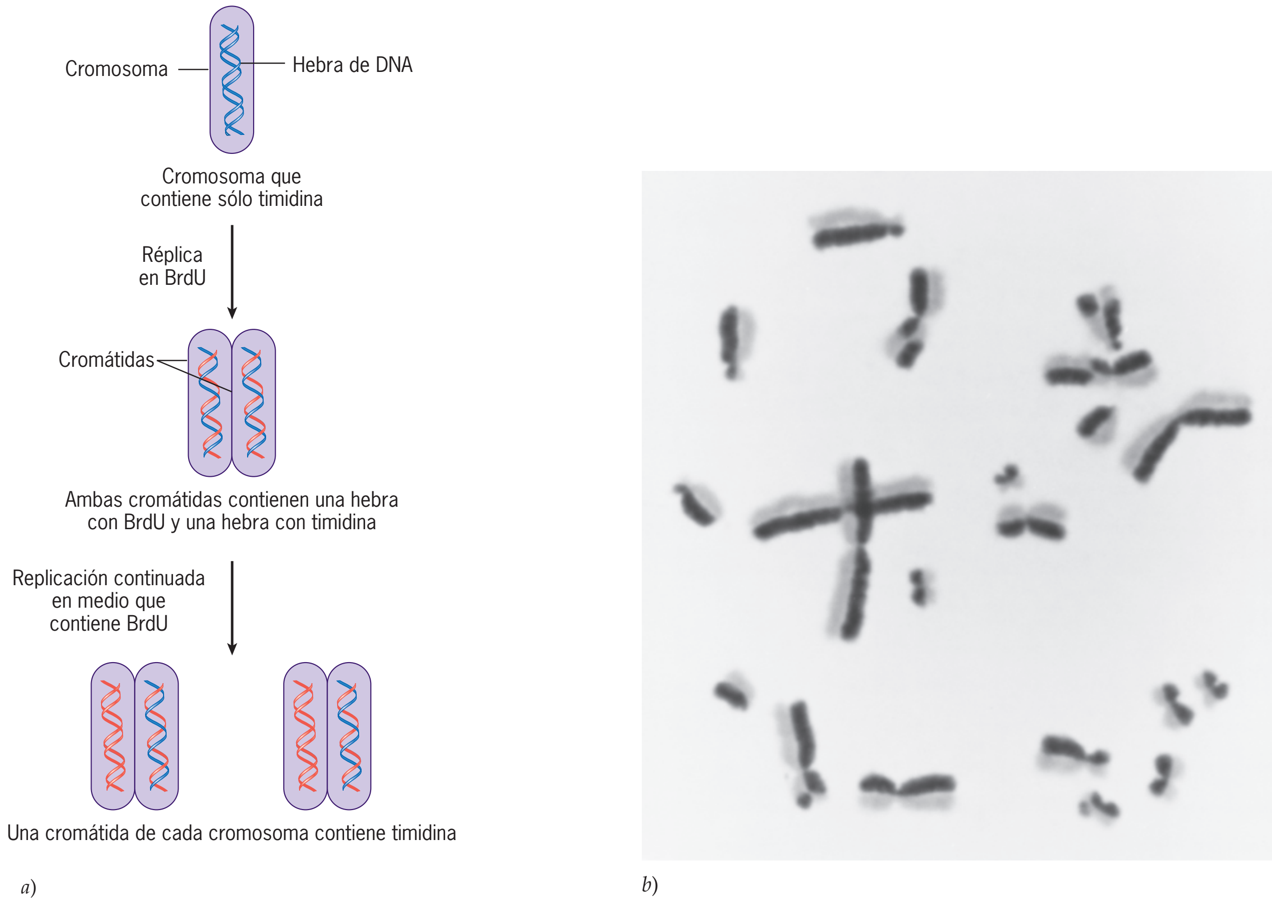



**FIGURA 13-4 Demostración experimental de que la replicación del DNA se produce semiconservativamente en células eucarióticas.** *a*) Diagrama esquemático de los resultados de un experimento en el que las células se transfirieron de un medio que contenía timidina a uno que contenía bromodesoxiuridina (BrdU) y se les permitió completar dos rondas sucesivas de replicación. Las hebras de DNA que contienen BrdU se muestran en rojo. *b*) Los resultados de un experimento similar al que se muestra en *a*). En este experimento, las células de mamífero cultivadas crecieron en BrdU durante dos rondas de replicación antes de que se prepararan los cromosomas mitóticos y se tiñeran mediante un procedimiento que utilizaba tintes fluorescentes y tinción de Giemsa. Con este procedimiento, las cromátidas que contienen timidina dentro de una o ambas hebras se tiñen con tono oscuro, mientras que las cromátidas que contienen solo BrdU se tiñen de manera ligera. La fotografía indica que, después de dos rondas de replicación en BrdU, una cromátida de cada cromosoma duplicado contiene solo BrdU, mientras que la otra cromátida contiene una hebra de DNA marcada con timidina. (Algunos de los cromosomas intercambian porciones homólogas entre las cromátidas hermanas. Este proceso de intercambio de cromátidas hermanas es común durante la mitosis, pero no se discute en el texto.)

FUENTE: *b*) Cortesía de Sheldon Wolff.

## 13.2 Replicación de DNA en células bacterianas

Esta sección del capítulo se centrará en la replicación en células bacterianas, que se entiende mejor que el proceso correspondiente en las eucariotas. El progreso temprano en la investigación bacteriana fue impulsado por enfoques genéticos y bioquímicos que incluyen:

- La disponibilidad de mutantes que no pueden sintetizar una u otra proteína requerida para el proceso de replicación. El aislamiento de mutantes incapaces de replicar su cromosoma puede parecer paradójico: ¿cómo pueden cultivarse las células con un defecto en este proceso vital? Esta paradoja se resolvió mediante el aislamiento de **mutantes sensibles a la temperatura** (ts, *temperatura-sensitive*), en los que la deficiencia solo se revela a una temperatura elevada, denominada *temperatura no permisiva (o restrictiva)*. Cuando crece a temperatura más baja (*permisiva*), la proteína mutante puede funcionar suficientemente bien para llevar a cabo su actividad requerida, y las células pueden continuar creciendo y dividiéndose. Se han aislado mutantes sensibles a la temperatura que afectan prácticamente a todo tipo de actividad fisiológica (véase también p. 261), y han sido particularmente importantes en el estudio de la síntesis de DNA como ocurre en la replicación, la reparación del DNA y la recombinación genética.
- El desarrollo de sistemas *in vitro* en los que la replicación puede estudiarse utilizando componentes celulares purificados. En algunos estudios, la molécula de DNA a ser replicada se incuba con extractos celulares de los que se han eliminado proteínas específicas supuestamente esenciales. En otros estudios, el DNA se incuba con una variedad de proteínas purificadas cuya actividad debe probarse.

En conjunto, estos enfoques han revelado la actividad de más de 30 proteínas diferentes que se requieren para replicar el cromosoma de la *E. coli*. En las siguientes secciones, se discutirán las actividades de varias de estas proteínas cuyas funciones han sido claramente definidas. La replicación en las bacterias y las eucariotas ocurre por mecanismos muy similares, y así la mayoría de la información presentada en la discusión de la replicación bacteriana también se aplica a las células eucariotas.

## Horquillas de replicación y replicación bidireccional

La replicación comienza en un sitio específico en el cromosoma bacteriano llamado **origen**. El **origen de replicación** en el cromosoma de la *E. coli* es una secuencia específica llamada *oriC* donde se unen varias proteínas para **iniciar** el proceso de replicación.[2] Una vez iniciada, la replicación procede hacia afuera desde el origen en ambas direcciones, es decir, *bidireccionalmente* (consúltese **FIGURA 13-5**). Los sitios en la figura 13-5 donde el par de segmentos replicados se juntan y se unen al DNA no replicado se denominan **horquillas de replicación**. Cada horquilla de replicación corresponde a un sitio donde 1) la doble hélice parental experimenta una separación de la hebra y 2) se están incorporando nucleótidos en las hebras complementarias recién sintetizadas. Las dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas hasta que se encuentran en un punto a través del círculo desde el origen, donde finaliza la replicación. Los dos dúplex recién replicados se separan unos de otros y finalmente se dirigen a dos células diferentes.

[2] El tema del inicio de la replicación se discute en detalle en la página 526, como ocurre en las eucariotas.

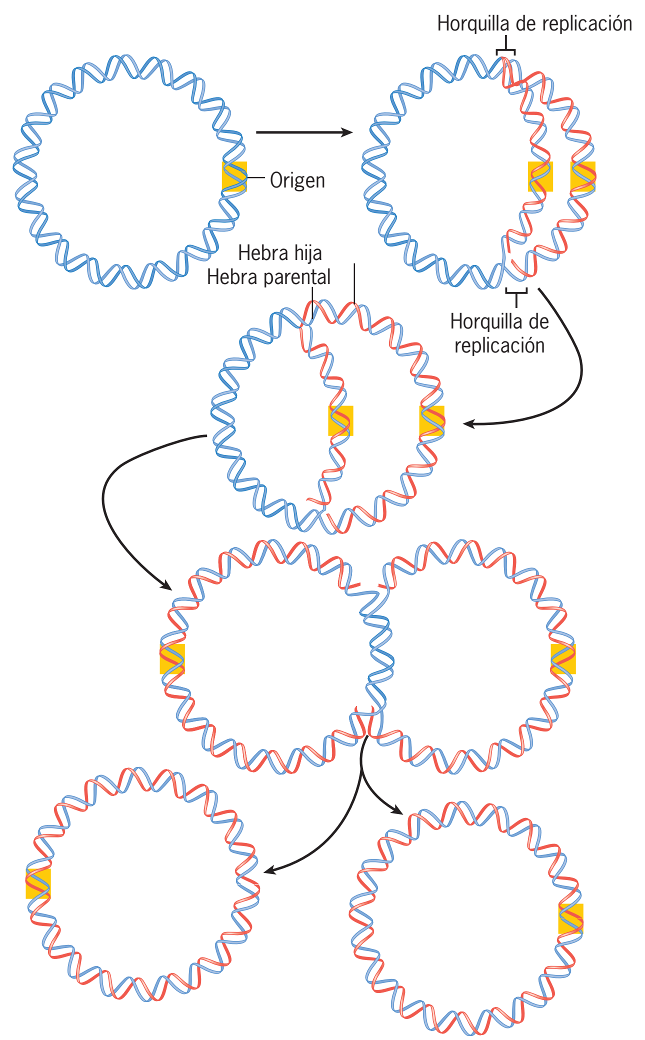



**FIGURA 13-5 Modelo de un cromosoma bacteriano circular sometido a replicación semiconservante bidireccional.** Dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas desde un solo origen. Cuando las horquillas de replicación se encuentran en el punto opuesto del círculo, la replicación finaliza y las dos dúplex replicadas se separan una de otra. Las nuevas hebras de DNA se muestran en rojo.

## Desenrollado del dúplex y separación de las hebras

La separación de las hebras de un DNA dúplex circular y helicoidal plantea importantes problemas topológicos. Para visualizar las dificultades, se puede considerar brevemente una analogía entre un DNA dúplex y una cuerda helicoidal de dos hebras. Considérese lo que sucedería si se colocara una pieza lineal de esta cuerda en el suelo, se agarrara las dos hebras en un extremo y comenzaran a separarse las hebras justo cuando el DNA se separa durante la replicación. Es evidente que la separación de las hebras de una doble hélice es también un proceso de *desenrollado* de la estructura. En el caso de una cuerda, que es libre de girar alrededor de su eje, la separación de las hebras en un extremo estaría acompañada por la rotación de la fibra completa, ya que resistió el desarrollo de la tensión. Ahora, considérese lo que sucedería si el otro extremo de la cuerda estuviera unido a un gancho en una pared (véase **FIGURA 13-6*a***). En estas circunstancias, la separación de las dos hebras en el extremo libre generaría una tensión de torsión creciente en la cuerda y haría que la parte no separada se enrollara más apretadamente. La separación de las dos hebras de una molécula de DNA circular (o una molécula lineal que no puede rotar libremente, como es el caso en un cromosoma eucariótico grande) es análoga a tener un extremo de una molécula lineal unida a una pared; en todos estos casos, la tensión que se desarrolla en la molécula no se puede aliviar mediante la rotación de la molécula completa. A diferencia de una cuerda, que puede sobreenrollarse fuertemente (como en la figura 13-6*a*), una molécula de DNA sobreenrollada queda positivamente superenrollada (p. 381). En consecuencia, el movimiento

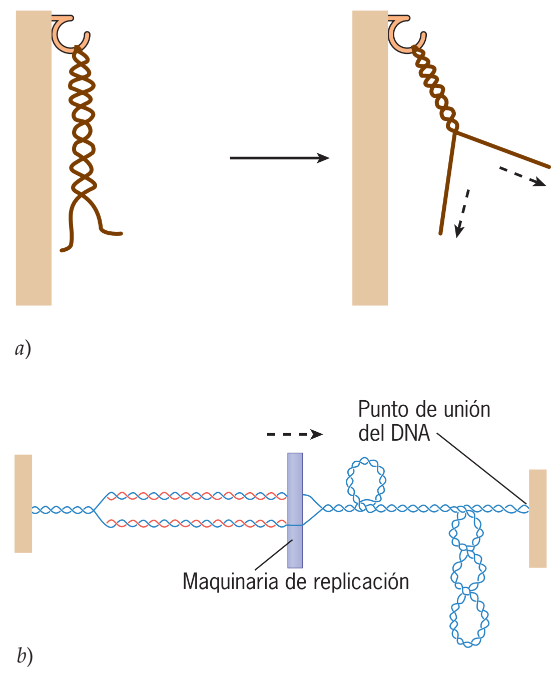



**FIGURA 13-6 El problema del desenrollado.** *a*) Efecto de desenrollar una cuerda de dos hebras que tiene un extremo unido a un gancho. La porción no separada se enrolla más apretadamente. *b*) Cuando se replica una molécula de DNA circular o unida, el DNA que está delante de la maquinaria de replicación se sobreenrolla y acumula superenrollados positivos. Las células poseen topoisomerasas, como la DNA girasa de la *E. coli*, que eliminan los superenrollados positivos.

FUENTE: *b*) Tomada de J. C. Wang, *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2002;3:434, copyright 2002. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* por Nature Publishing Group. Reproducida con el permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

de la horquilla de replicación genera superenrollamientos positivos en la parte no replicada del DNA delante de la horquilla (véase figura 13-6*b*). Cuando se considera que un cromosoma circular completo de la *E. coli* contiene aproximadamente 400 000 vueltas y se replica por dos horquillas en 40 minutos, la magnitud del problema se vuelve evidente.

Se observó en la página 381 que las células contienen enzimas, llamadas topoisomerasas, que pueden cambiar el estado de superenrollamiento en una molécula de DNA. Una enzima de este tipo, llamada **DNA girasa**, una topoisomerasa tipo II, alivia la tensión mecánica que se acumula durante la replicación en la *E. coli*. Las moléculas de DNA girasa viajan a lo largo del DNA por delante de la horquilla de replicación y eliminan los superenrollamientos positivos. La DNA girasa logra esta proeza mediante la división de ambas hebras del DNA dúplex, al pasar un segmento de DNA a través de la ruptura de la doble hebra al otro lado y luego sellar los cortes, un proceso que se impulsa por la energía liberada durante la hidrólisis del ATP (se muestra en detalle en figura 10-14*b*). Las células eucariotas poseen enzimas similares que llevan a cabo esta función requerida.

## Las propiedades de las DNA polimerasas

Comienza la discusión sobre el mecanismo de la replicación del DNA mediante la descripción de algunas de las propiedades de las **DNA polimerasas**, las enzimas que sintetizan nuevas hebras de DNA. El estudio de estas enzimas se inició en la década de 1950 por Arthur Kornberg en la Universidad de Washington. En sus experimentos iniciales, Kornberg y sus colegas purificaron una enzima de extractos bacterianos que incorporaban precursores de DNA marcados radiactivamente en un polímero insoluble en ácido identificado como DNA. La enzima se denominó *DNA polimerasa* (y más tarde, después del descubrimiento de enzimas polimerizantes de DNA adicionales, se denominó *DNA polimerasa I*). Para que la reacción continuara, la enzima requirió la presencia del DNA y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dTTP, dATP, dCTP y dGTP). El DNA recién sintetizado, marcado radiactivamente tenía la misma composición de base que el DNA original no marcado, lo que sugiere en alto grado que las hebras de DNA originales habían servido como **plantillas** para la reacción de polimerización.

A medida que se descubrieron propiedades adicionales de la DNA polimerasa, se hizo evidente que la replicación era más compleja de lo que se pensaba anteriormente. Cuando se probaron varios tipos de plantillas del DNA, se descubrió que dicha plantilla del DNA tenía que cumplir ciertos requisitos estructurales si se quería promover la incorporación de precursores marcados (consúltese **FIGURA 13-7**). Una molécula de DNA intacta, de doble hebra, por ejemplo, no estimulaba la incorporación. Esto no fue sorprendente teniendo en cuenta el requisito de que las hebras de la hélice deben separarse para que ocurra la replicación. Era menos obvio por qué una molécula circular de una sola hebra también carecía de actividad; se podría esperar que esta estructura fuera un plantilla ideal para dirigir la fabricación de una hebra complementaria. Por el contrario, la adición de una molécula de DNA parcialmente bicatenaria a la mezcla de reacción produjo una incorporación inmediata de nucleótidos.

Pronto se descubrió que un DNA circular monocatenario no puede servir como plantilla para la DNA polimerasa porque la enzima no puede *iniciar* la formación de una hebra de DNA. Por el contrario, solo puede agregar nucleótidos al terminal hidroxilo 3′ de una hebra existente. La hebra que proporciona el terminal 3′OH necesario se llama **primaria**. Todas las DNA polimerasas —tanto procariotas como eucariotas— tienen estos dos requisitos básicos (véase figura 13-8*a*): una plantilla de hebra de DNA para copiar y una hebra primaria a la que se pueden agregar nucleótidos. Estos requisitos explican por qué ciertas estructuras de DNA no promueven la síntesis de DNA (véase figura 13-7*a*). Una doble

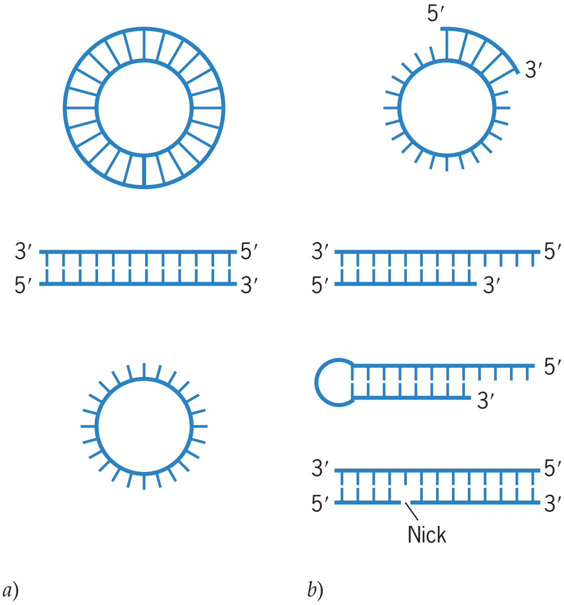



**FIGURA 13-7 Plantillas y no plantillas para la actividad de la DNA polimerasa.** *a*) Ejemplos de estructuras de DNA que no estimulan la síntesis de DNA *in vitro* por DNA polimerasa aislada de la *E. coli*. *b*) Ejemplos de estructuras de DNA que estimulan la síntesis de DNA *in vitro*. En todos los casos, las moléculas en *b*) contienen una hebra plantilla para copiar y una hebra primaria con un 3′OH en el que se agregan nucleótidos.

hélice lineal intacta proporciona el terminal hidroxilo 3′ pero carece de una plantilla. Una hebra única circular, por otro lado, proporciona una plantilla, pero carece de un primario. La molécula parcialmente bicatenaria (obsérvese figura 13-7*b*) satisface ambos requisitos y de este modo promueve la incorporación de nucleótidos. El hallazgo de que la DNA polimerasa no puede iniciar la síntesis de una hebra de DNA plantea una pregunta importante: ¿Cómo se inicia la síntesis de una nueva hebra en la célula? Se volverá a esta pregunta en breve. La DNA polimerasa purificada por Kornberg tenía otra propiedad que era difícil de entender en términos de su presunta función como enzima de replicación: solo sintetizaba DNA en una dirección de 5′-a- 3′ (escrita 5′→ 3′). Como Watson y Crick descubrieran, las dos hebras de una hélice de DNA tienen una orientación antiparalela. El diagrama de la replicación del DNA presentado por primera vez por Watson y Crick (véase figura 13-1) describía los eventos como se *esperaría* que ocurrieran en la horquilla de replicación. El diagrama sugiere que una de las hebras recién sintetizadas se polimeriza en una dirección de 5′→ 3′, mientras que la otra hebra se polimeriza en una dirección de 3′→ 5′. ¿Hay alguna otra enzima responsable de la construcción de la hebra 3′→ 5′? ¿Funciona la enzima de manera diferente en la célula que en condiciones *in vitro*? Se volverá a esta pregunta también.

Durante la década de 1960 hubo indicios de que la “enzima Kornberg” no era la única DNA polimerasa en una célula bacteriana. En 1969 se aisló una cepa mutante de la *E. coli* que tenía menos de 1% de la actividad normal de la enzima, pero fue capaz de multiplicarse a la velocidad normal. Otros estudios revelaron que la enzima Kornberg, o *DNA polimerasa I*, era solo una de varias DNA polimerasas distintas presentes en las células bacterianas y, de hecho, no era la polimerasa la que replicaba la mayor parte del DNA. En cambio, la principal enzima responsable de la replicación del DNA (es decir, la polimerasa replicativa) es la *DNA polimerasa III*. Una célula bacteriana típica contiene de 300 a 400 moléculas de DNA polimerasa I pero solo alrededor de 10 copias de DNA polimerasa III. La presencia de DNA polimerasa III se había enmascarado por las cantidades mucho mayores de DNA polimerasa I en la célula. Pero el descubrimiento de otras

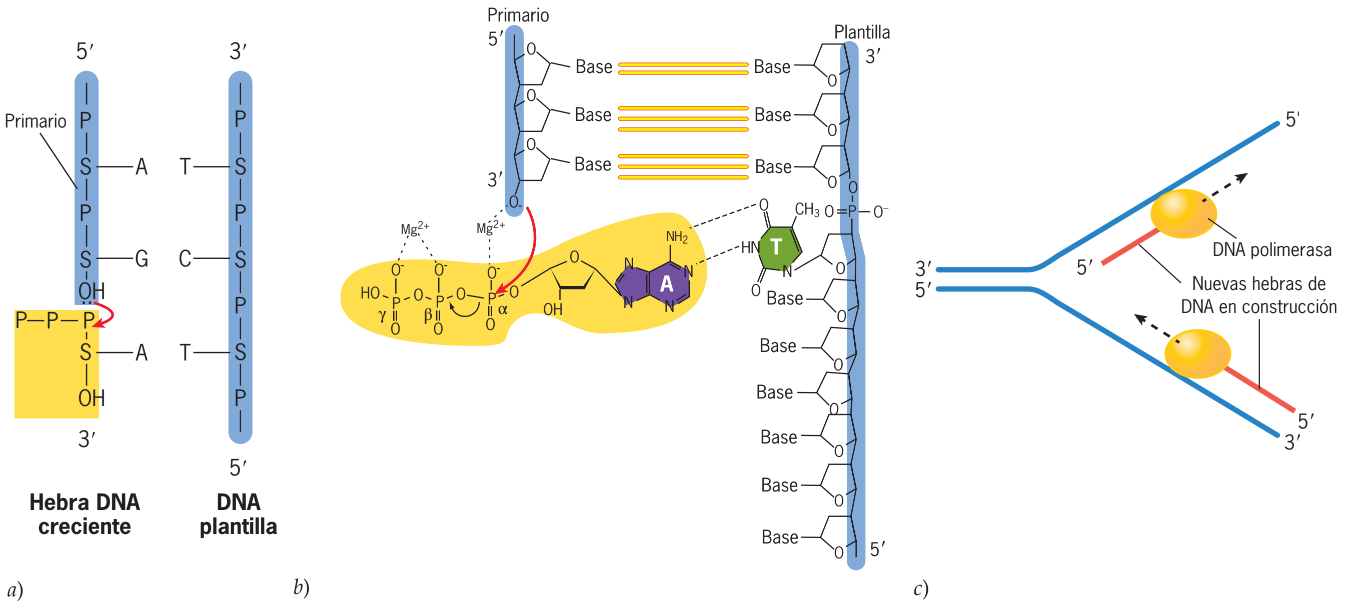



**FIGURA 13-8 Actividad de una DNA polimerasa.** *a*) Polimerización de un nucleótido en el terminal 3′ de la hebra primaria. La enzima selecciona los nucleótidos para su incorporación en función de su capacidad para emparejarse con el nucleótido de la hebra plantilla. *b*) Modelo simplificado del mecanismo de ion de dos metales para la reacción en la que los nucleótidos se incorporan en una hebra de DNA en crecimiento mediante una DNA polimerasa. En este modelo, uno de los iones de magnesio extrae el protón del grupo 3′hidroxilo del nucleótido terminal del primario, lo que facilita el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno 3′ cargado negativamente en el α-fosfato del nucleósido trifosfato entrante. El segundo ion de magnesio estabiliza el pirofosfato, promoviendo su liberación. Los dos iones metálicos están unidos a la enzima por residuos de ácido aspártico altamente conservados del sitio activo. *c*) Diagrama esquemático que muestra la dirección de movimiento de cada polimerasa a lo largo de las dos hebras plantillas.

DNA polimerasas no respondió a las dos preguntas básicas planteadas anteriormente; ninguna de las enzimas puede iniciar hebras de DNA, ni pueden construir ninguna de ellas hebras en una dirección de 3′→ 5′.

## Replicación semidiscontinua

La falta de actividad de polimerización en la dirección de 3′→ 5′ tiene una explicación sencilla: las hebras de DNA no se pueden sintetizar en esa dirección. Por el contrario, ambas hebras recién sintetizadas se ensamblan en una dirección de 5′→ 3′. Durante la reacción de polimerización, el grupo —OH en el terminal 3′ del primario lleva a cabo un ataque nucleófilo sobre el α-fosfato 5′ del nucleósido trifosfato entrante, como se muestra en la figura 13-8*b*). Las moléculas de polimerasa responsables de la construcción de las dos nuevas hebras de DNA se mueven en una dirección de 3′-a-5′ a lo *largo de la plantilla*, y ambas construyen una hebra que crece mediante la adición de nucleótidos a su terminal 3′-OH (consúltese **FIGURA 13-8c**). En consecuencia, una de las hebras recién sintetizadas crece hacia la horquilla de replicación donde las hebras de DNA parentales se separan, mientras que la otra hebra crece alejada de la horquilla.

Aunque esto resuelve el problema relacionado con una enzima que sintetiza una hebra en una sola dirección, crea un dilema aún más complicado. En la figura 13-8*c*) es evidente que la hebra que crece hacia la horquilla puede construirse mediante la adición continua de nucleótidos a su terminal 3′. Pero, ¿cómo se sintetiza la otra? Pronto se recopilaron pruebas para indicar que la hebra que crece alejada de la horquilla de replicación se sintetiza de forma *discontinua*, es decir, como fragmentos (véase figura 13-9). Antes de que se pueda iniciar la síntesis de un fragmento, se debe exponer un tramo de plantilla adecuado mediante el movimiento de la horquilla de replicación. Una vez iniciada, cada fragmento crece alejado de la horquilla de replicación hacia el terminal 5′ de un fragmento previamente sintetizado al que posteriormente se une. Así, las dos hebras recién sintetizadas de las hijas dúplex se sintetizan mediante procesos muy diferentes. La hebra que se sintetiza de forma continua se denomina **hebra adelantada** porque su síntesis continúa a medida que avanza la horquilla de replicación. La hebra que se sintetiza de forma discontinua se denomina **hebra retrasada** porque la iniciación de cada fragmento debe esperar a que las hebras parentales se separen y expongan una plantilla adicional (véase **FIGURA 13-9**).

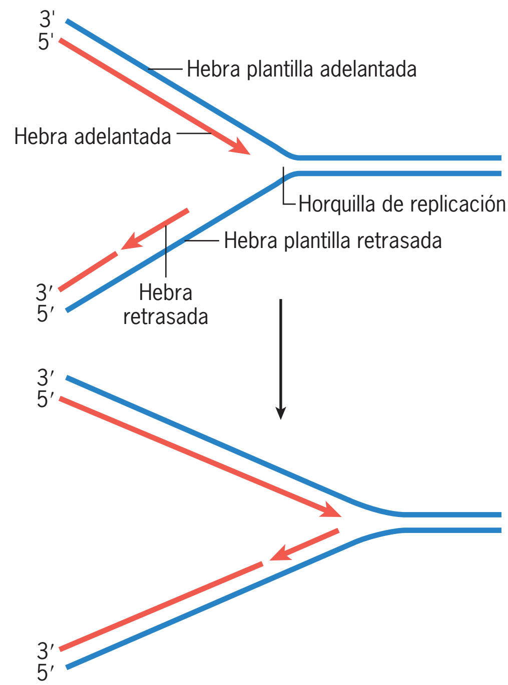



**FIGURA 13-9 Las dos hebras de una doble hélice se sintetizan mediante una secuencia diferente de eventos.** Las moléculas de DNA polimerasa se mueven a lo largo de una plantilla solo en una dirección de 3′→ 5′. Como resultado, las dos hebras recién ensambladas crecen en direcciones opuestas, una crece hacia la horquilla de replicación y la otra crece alejándose de ella. Una hebra se ensambla de manera continua, la otra como fragmentos que se unen entre sí enzimáticamente. El diagrama que se muestra aquí representa las diferencias en la síntesis de las dos hebras.

Como se discutió en la página 521, ambas hebras probablemente se sintetizan simultáneamente, de modo que los términos de *adelanto* y *retraso* pueden no ser tan apropiados como se pensaba cuando se acuñaron por primera vez. Debido a que una hebra se sintetiza continuamente y la otra discontinuamente, se dice que la replicación es *semidiscontinua*.

El descubrimiento de que una hebra estaba sintetizada como pequeños fragmentos fue realizado por Reiji Okazaki de la Universidad de Nagoya, Japón, luego de varios tipos de experimentos de marcaje. Okazaki descubrió que si las bacterias se incubaban en [3H]timidina durante unos segundos e inmediatamente se eliminaban, la mayor parte de la radiactividad se podía encontrar como parte de pequeños fragmentos de DNA de 1 000 a 2 000 nucleótidos de longitud. Por el contrario, si las células se incubaban en el precursor de DNA marcado durante uno o dos minutos, la mayor parte de la radiactividad incorporada se convertía en parte de moléculas de DNA mucho más grandes (véase **FIGURA 13-10**). Estos resultados indicaron que una parte del DNA se construyó en segmentos pequeños (más tarde llamados **fragmentos de Okazaki**) que se unieron rápidamente a piezas más largas que se habían sintetizado previamente. La enzima que une los fragmentos de Okazaki en una hebra continua se llama **DNA ligasa**.

El descubrimiento de que la hebra retrasada se sintetiza en piezas planteó una nueva serie de preguntas desconcertantes sobre el inicio de la síntesis de DNA. ¿Cómo comienza la síntesis de cada uno de estos fragmentos cuando ninguna de las DNA polimerasas es capaz de iniciar la hebra? Otros estudios revelaron que la iniciación no se realiza mediante una DNA polimerasa sino, más bien, mediante un tipo distinto de RNA polimerasa, llamada **primasa**, que construye un primario corto compuesto de RNA, no de DNA. La hebra adelantada, cuya síntesis comienza en el origen de replicación, también se inicia por una molécula de primasa. Los RNA cortos sintetizados por la primasa en el terminal 5′ de la hebra adelantada y en el terminal 5′ de cada fragmento de Okazaki sirven como el primario requerido para la síntesis de DNA por una DNA polimerasa. Los RNA primarios se eliminan posteriormente, y los espacios resultantes en la hebra se llenan con DNA y luego se sellan mediante DNA ligasa. Estos eventos se ilustran esquemáticamente en la **FIGURA 13-11**. La formación de RNA primarios transitorios durante el proceso de replicación del DNA es una actividad curiosa. Se cree que la probabilidad de errores es mayor durante la iniciación que durante el alargamiento, y el uso de un segmento corto de RNA degradable evita la inclusión de bases desajustadas.

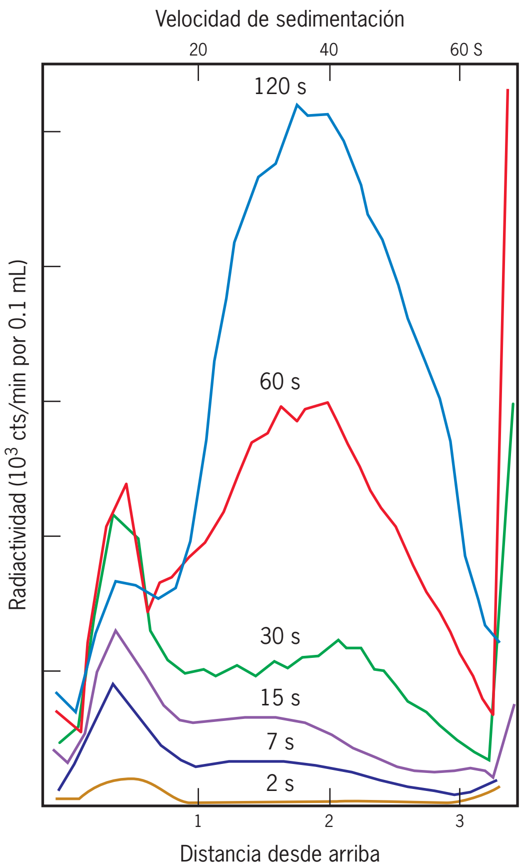



**FIGURA 13-10 Resultados de un experimento que muestra que parte del DNA se sintetiza en pequeños fragmentos.** Perfiles de gradiente de densidad de sacarosa de DNA de un cultivo de células de la *E. coli* infectadas con fago. Las células se marcaron por cantidades de tiempo crecientes, y se determinó la velocidad de sedimentación del DNA marcado. Cuando el DNA se preparó después de pulsos muy cortos, un porcentaje significativo de la radiactividad apareció en pedazos muy cortos de DNA (representados por el pico cerca de la parte superior del tubo a la izquierda). Después de periodos de 60-120 segundos, la altura relativa de este pico disminuye a medida que los fragmentos de DNA marcados se unen a los extremos de las moléculas de alto peso molecular.

FUENTE: Tomada de R. Okazaki, *et al. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1968;33:130. Reproducida con permiso de Cold Spring Harbor Laboratory Press.

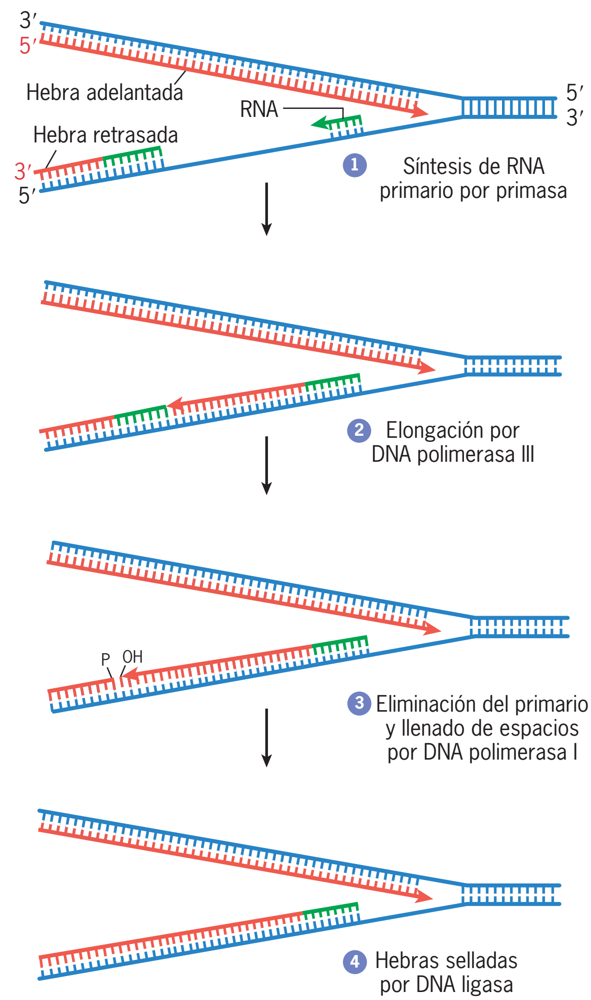



**FIGURA 13-11 Uso de fragmentos cortos de RNA como primarios removibles al iniciar la síntesis de cada fragmento de Okazaki de la hebra retrasada.** Los pasos principales se indican en el dibujo y se discuten en el texto. Las funciones de varias proteínas accesorias en estas actividades se indican en las siguientes figuras.

**REPASO**

1. ¿Cómo es posible obtener mutantes cuyos defectos se encuentran en los genes que se requieren para una actividad esencial como la replicación del DNA?
2. Describa los eventos que ocurren en un origen de replicación durante el inicio de la replicación en células de levadura. ¿Qué quiere decir que la replicación es bidireccional?
3. ¿Por qué las moléculas de DNA representadas en la figura 13-7*a*) no estimulan la polimerización de los nucleótidos por la DNA polimerasa I? ¿Cuáles son las propiedades de una molécula de DNA que le permiten servir como plantilla para la incorporación de nucleótidos por la DNA polimerasa I?
4. Describa el mecanismo de acción de las DNA polimerasas que operan en las dos hebras plantillas y el efecto que esto tiene sobre la síntesis de la hebra retrasada frente a la hebra adelantada.

## 13.3 La maquinaria que opera en la horquilla de replicación

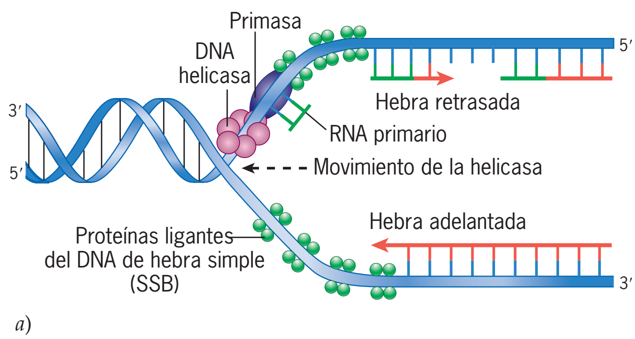
La replicación implica más que la incorporación de nucleótidos. El desenrollado del dúplex y la separación de las hebras requieren la ayuda de dos tipos de proteínas que se unen al DNA, una **helicasa** (o enzima de desenrollado del DNA) y **proteínas ligantes de DNA de hebra simple (SSB,** *single-stranded DNA-binding*). Las helicasas de DNA desenrollan un DNA dúplex en una reacción que usa energía liberada por la hidrólisis de ATP para moverse a lo largo de una de las hebras del DNA, se rompen los enlaces de hidrógeno que mantienen las dos hebras juntas y se expone la hebra simple de DNA plantilla. La *E. coli* tiene al menos 12 helicasas diferentes para su uso en diversos aspectos del metabolismo del DNA (y el RNA). Una de estas helicasas —producto del gen *dnaB*— funciona como la principal máquina de desenrollar durante la replicación. La helicasa DnaB consta de seis subunidades dispuestas para formar una proteína en forma de anillo que rodea una sola hebra del DNA (obsérvese **FIGURA 13-12*a***). El inicio de la replicación comienza en la *E. coli* cuando las copias múltiples de la proteína DnaA se unen al origen de replicación (*oriC*) y separan (funden) las hebras de DNA en ese sitio. La helicasa DnaB se carga luego en el DNA de hebra simple de la hebra retrasada de *oriC*, con la ayuda de la proteína DnaC. Luego, la helicasa de DnaB se transloca en una dirección de 5′→ 3′ a lo largo de la hebra plantilla retrasada y desenrolla la hélice a medida que avanza (consúltese figura 13-12). El desenrollado del DNA por la helicasa se ve favorecida por la unión de las proteínas SSB a las hebras de DNA separadas (véase figura 13-12). Estas proteínas se unen de manera selectiva al DNA de hebra simple, lo mantienen en un estado extendido y evitan que se vuelva a enrollar o dañe. En las micrografías electrónicas de la figura 13-12*b*) se ilustra un retrato visual de la acción combinada de una proteína del DNA helicasa y SSB en la estructura de la doble hélice del DNA.

Se recuerda que una enzima llamada primasa inicia la síntesis de cada fragmento de Okazaki. En las bacterias, la primasa y la helicasa se asocian de manera transitoria para formar lo que se denomina un "primosoma". De los dos miembros del primosoma, la helicasa se mueve a lo largo de la hebra plantilla retrasada en el proceso (es decir, sin liberarse de la hebra plantilla durante el tiempo de vida de la horquilla de replicación).

A medida que la helicasa se "mueve" a lo largo de la hebra plantilla retrasada, abre las hebras del dúplex, la primasa se une de forma periódica a la helicasa, y sintetiza los primarios cortos de RNA que comienzan la formación de cada fragmento de Okazaki. Como se indicó con anterioridad, los RNA primarios se extienden posteriormente como DNA mediante una DNA polimerasa, específicamente la DNA polimerasa III.

El cuerpo de evidencias sugiere que la misma molécula de DNA polimerasa III sintetiza fragmentos sucesivos de la hebra retrasada. Para lograr esto, la molécula de polimerasa III se recicla desde el sitio donde acaba de completar un fragmento de Okazaki hasta el siguiente sitio a lo largo de la hebra plantilla retrasada, más cerca del sitio de desenrollado del DNA. Una vez en el nuevo sitio, la polimerasa se une al 3′ OH del RNA primario que acaba de establecerse por una primasa y comienza a incorporar desoxirribonucleótidos en el extremo del RNA corto.

¿Cómo se mueve una molécula de la polimerasa III desde un sitio en la hebra plantilla retrasada a otro sitio que está más cerca de la horquilla de replicación? La enzima hace esto "enganchándose en el recorrido" con la DNA polimerasa que se mueve en esa dirección a lo largo de la plantilla adelantado. Por tanto, aunque las dos polimerasas se muevan en direcciones opuestas con respecto al eje lineal de la molécula del DNA, son, de hecho, parte de un único complejo de proteína (véase **FIGURA 13-13**). Las dos polimerasas atadas pueden replicar ambas hebras al enlazar el DNA de la hebra plantilla retrasada sobre sí mismo, lo que hace que esta plantilla tenga la misma orientación que la hebra plantilla adelantada. Ambas polimerasas pueden moverse juntas como



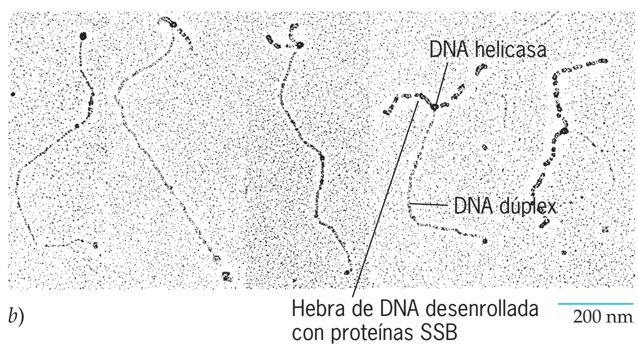




**FIGURA 13-12 Funciones de la helicasa de DNA, las proteínas ligantes del DNA de hebra simple y la primasa en la horquilla de replicación.** *a*) La helicasa se mueve a lo largo del DNA, y cataliza el desenrollado del dúplex impulsado por ATP. A medida que se desenrolla el DNA, se evita que las hebras vuelvan a formar el dúplex mediante proteínas tetraméricas ligantes a DNA de hebra simple (SSB, *single-stranded DNA-binding proteins*). La primasa asociada con la helicasa sintetiza los RNA primarios que comienzan cada fragmento de Okazaki. Los RNA primarios, que tienen aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, se eliminan posteriormente. *b*) Una serie de cinco micrografías electrónicas que muestran las moléculas del DNA incubadas con una DNA helicasa viral (antígeno T, p. 528) y proteínas SSB de la *E. coli*. Las moléculas del DNA se desenrollan de forma progresiva de izquierda a derecha. La helicasa aparece como la partícula redonda en la horquilla, y las proteínas SSB se unen a los extremos de hebra simple, dándoles un aspecto engrosado.

FUENTE: *b*) De Rainer Wessel, Johannes Schweizer y Hans Stahl, *J Virol* 1992;66:807. © American Society for Microbiology.

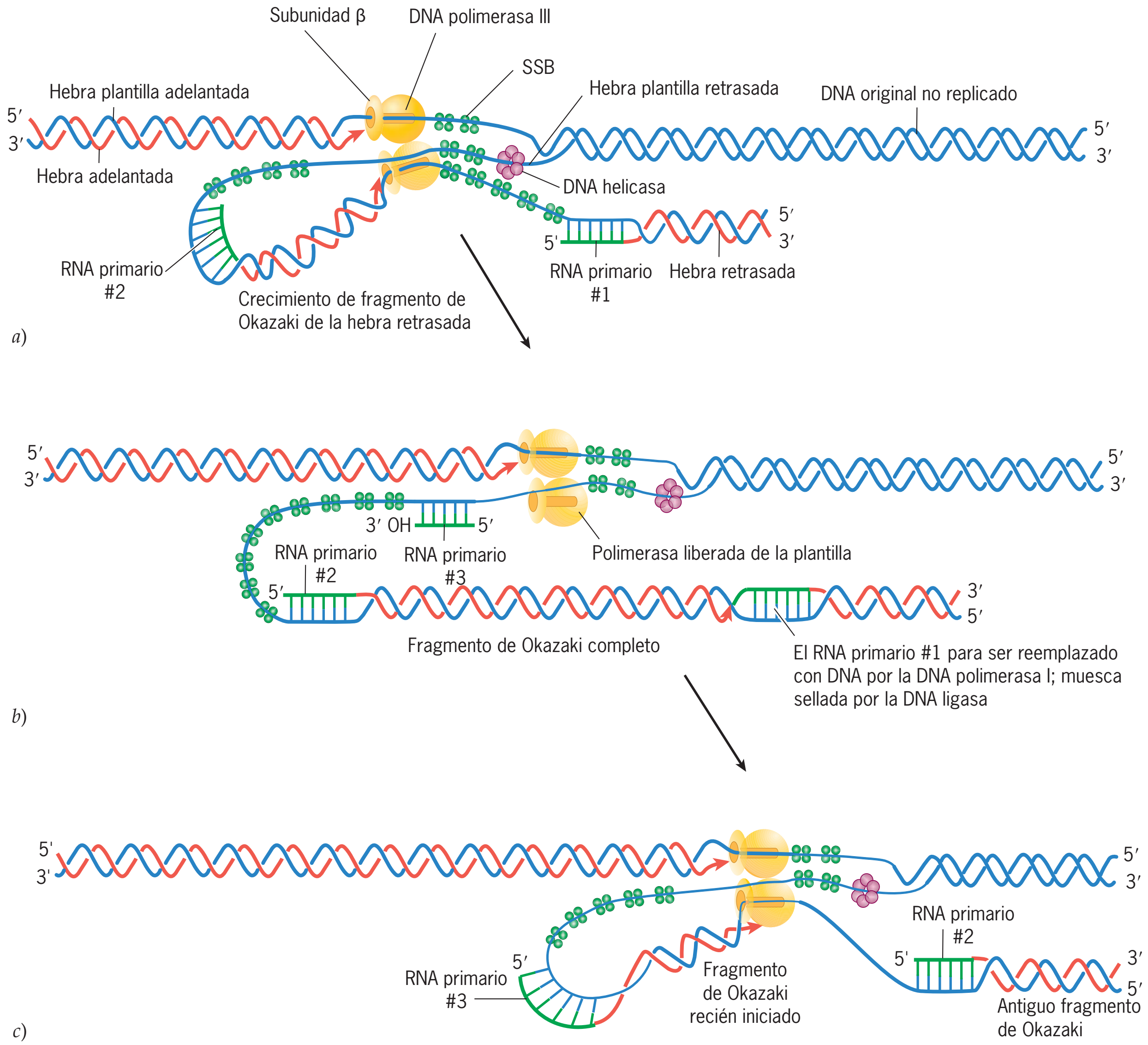



**FIGURA 13-13 La replicación de las hebras adelantadas y retrasadas en la *E. coli* se lleva a cabo mediante dos DNA polimerasas, las cuales trabajan juntas como parte de un único complejo.** *a*) Las dos moléculas de DNA polimerasa III viajan juntas, a pesar de que se mueven hacia los extremos opuestos de sus respectivas plantillas. Esto se logra al provocar que la hebra plantilla retrasada forme un lazo. *b*) La polimerasa libera la hebra plantilla retrasada cuando encuentra el fragmento de Okazaki previamente sintetizado. *c*) La polimerasa que estaba involucrada en el ensamblaje del fragmento de Okazaki anterior, ahora se vuelve a unir más rápido a la hebra plantilla retrasada a lo largo de su longitud, y sintetiza DNA en el extremo del RNA primario #3 que ha acabado de construir la primasa.

FUENTE: *a-c*) Tomada de D. Voet y J. G. VoeT, *Biochemistry*. 2a. ed. Copyright© 1995, John Wiley and Sons, Inc. Reimpreso con permiso de John Wiley and Sons, Inc.

parte de un solo complejo replicativo sin violar la “regla 5′→3′” para la síntesis de una hebra de DNA (véase figura 13-13). Una vez que la polimerasa que ensambla la hebra retrasada alcanza el extremo 5′ del fragmento de Okazaki que se sintetizó durante la ronda anterior, se libera la hebra plantilla retrasada y la polimerasa comienza a trabajar en el terminal 3′ del próximo RNA primario hacia la horquilla. El modelo que se representa en la figura 13-13 a menudo se conoce como el “modelo de trombón” porque el enlace de DNA de forma repetida crece y colapsa repetidamente durante la replicación de la hebra retrasada, que evoca el movimiento de “lazo” de un trombón de bronce cuando se toca. Estudios recientes han demostrado que el complejo de replicación, o replisoma, contiene tres copias de la DNA polimerasa III en lugar del modelo tradicional de dos copias que se presenta aquí. De acuerdo con este modelo revisado, dos de las tres enzimas actúan sobre la hebra retrasada y una actúa sobre la hebra adelantada. Los experimentos con moléculas únicas han encontrado que la presencia de la polimerasa extra genera que la síntesis de la hebra retrasada sea más eficiente, y también ayuda a que todo el replisoma se siga moviendo a lo largo de la plantilla de forma progresiva sin caerse. La manera en que se coordinan las actividades de las dos polimerasas de hebra retrasadas no está clara, pero el mecanismo de síntesis de la hebra retrasada se mantiene como se discute en esta sección.

## REPASO

1. Compare las funciones de las DNA polimerasas I y III en la replicación bacteriana.
2. ¿Cuál es la consecuencia de tener el DNA de la hebra plantilla retrasada enrollado sobre sí mismo como en la figura 13-13*a*)?

## 13.4 Estructura y funciones de las DNA polimerasas

La DNA polimerasa III, la enzima que sintetiza las hebras de DNA durante la replicación en la *E. coli*, es parte de una gran "máquina de replicación" llamada *holoenzima DNA polimerasa III* (consúltese **FIGURA 13-14**). Uno de los componentes no catalíticos de la holoenzima, denominada **abrazadera β**, mantiene la polimerasa asociada con el DNA plantilla. Las DNA polimerasas (como las RNA polimerasas) poseen dos propiedades algo contrastantes: 1) deben permanecer asociadas a la plantilla en tramos largos si van a sintetizar una hebra complementaria continua, y 2) deben estar lo suficientemente sueltas para poder moverse a través de la plantilla desde un nucleótido al siguiente. Estas propiedades contrastantes son proporcionadas por la abrazadera β en forma de rosquilla que rodea el DNA (véase **FIGURA 13-15*a***) y se desliza a lo largo de ella. Siempre que esté unido a una "abrazadera corrediza", una DNA polimerasa puede moverse de forma progresiva de un nucleótido al siguiente sin dispersarse fuera de la plantilla. La polimerasa en la hebra plantilla adelantada permanece unida a una sola abrazadera β durante la replicación. Por el contrario, cuando la polimerasa en la hebra plantilla retrasada completa la síntesis de un fragmento de Okazaki, se desengancha de la abrazadera β y se cicla a una nueva abrazadera β que se ha ensamblado en una unión DNA plantilla-RNA primario ubicada más cerca de la horquilla de replicación (obsérvese figura 13-15*b*). Pero, ¿cómo se introduce una molécula de DNA altamente elongada dentro de una abrazadera en forma de anillo como en la figura 13-15*a*)? El montaje de la abrazadera β alrededor del DNA

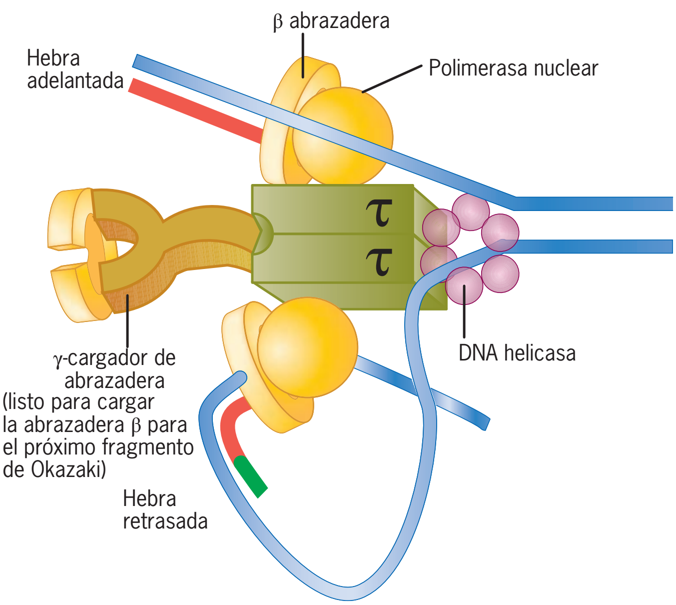



**FIGURA 13-14 Representación esquemática de la holoenzima de la DNA polimerasa III.** La holoenzima contiene 10 subunidades diferentes organizadas en varios componentes distintos. Incluido como parte de la holoenzima están 1) dos polimerasas centrales que replican el DNA, 2) dos o más abrazaderas β, las cuales permiten que la polimerasa permanezca asociada con el DNA, y 3) un complejo de carga de abrazadera (γ), que carga cada abrazadera corrediza en el DNA. El cargador de abrazadera de una horquilla de replicación activa contiene dos subunidades, que retienen las polimerasas centrales en el complejo y también unen la helicasa. Otro término, el *replisoma*, se usa a menudo para referirse al complejo completo de proteínas que está activo en la horquilla de replicación, que incluye la holoenzima de la DNA polimerasa III, la helicasa, las SSB y la primasa. (Si el replisoma bacteriano contiene tres moléculas de DNA polimerasa III, como se discutió en la página 522, entonces también contendría tres subunidades τ para contener todas las proteínas en un complejo, como se muestra en *Science* 2012;335:329).

FUENTE: Basada en dibujos de M. O'Donnell.

requiere un *cargador de abrazadera* multisubunidad que también es parte de la holoenzima de la DNA polimerasa III (véanse figuras 13-14, 13-15*c*). En el estado de unión al ATP, el cargador de abrazadera se une a una unión del primario-plantilla, mientras se mantiene la abrazadera β en una conformación abierta como se ilustra en la figura 13-15*c*). Una vez que el DNA se ha introducido a través de la abertura en la pared de la abrazadera, el ATP unido al cargador de la abrazadera se hidroliza, lo que provoca la liberación de la abrazadera, que se cierra alrededor del DNA. La abrazadera β está lista para unir la polimerasa III como se muestra en la figura 13-15*b*).

La DNA polimerasa I, que consiste en una sola subunidad, participa principalmente en la reparación del DNA, un proceso mediante el cual se corrigen las secciones dañadas del DNA (véase sección 13.8). La DNA polimerasa I también elimina los RNA primarios en el extremo 5′ de cada fragmento de Okazaki durante la replicación y los reemplaza con DNA, como se describe en la figura 13-13*b*). La capacidad de la enzima para lograr esta hazaña se analiza en la siguiente sección.

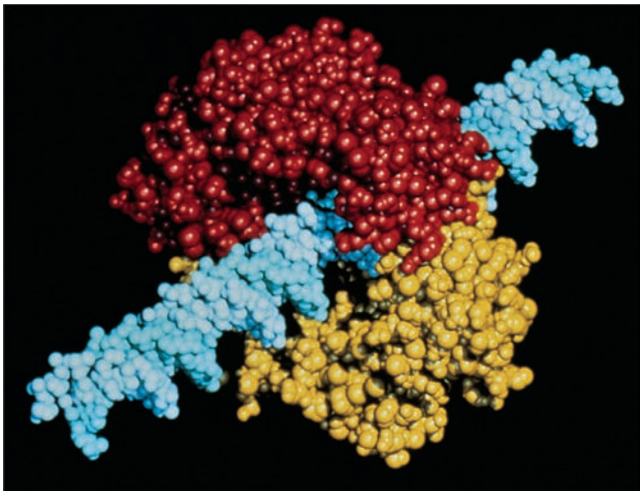
### Actividades exonucleasas de las DNA polimerasas

Ahora que hemos explicado varias de las desconcertantes propiedades de la DNA polimerasa I, como la incapacidad de la enzima para iniciar la síntesis de hebras, se pueden considerar otras observaciones curiosas. Kornberg descubrió que las preparaciones de DNA polimerasa I siempre contenían actividades exonucleasa; es decir, fueron capaces de degradar los polímeros de DNA al eliminar uno o más nucleótidos del extremo de la molécula. Al principio, Kornberg supuso que esta actividad se debía a una enzima contaminante porque la acción de las exonucleasas es tan radicalmente opuesta a la de la síntesis de DNA. No obstante, la actividad exonucleasa no pudo eliminarse de la preparación de la polimerasa y, de hecho, era una verdadera actividad de la molécula de la polimerasa. Posteriormente se demostró que todas las DNA polimerasas bacterianas poseen actividad exonucleasa. Las exonucleasas se pueden dividir en 5′→3′ y 3′→5′ exonucleasas, dependiendo de la dirección en la que se degrada la hebra. La DNA polimerasa I tiene actividades de exonucleasa 3′→5′ y 5′→3′, además de su actividad de polimerización (consúltese **FIGURA 13-16**). Estas tres actividades se encuentran en diferentes dominios del único polipéptido. Por tanto, de manera notable, la DNA polimerasa I son tres enzimas diferentes en una. Las dos actividades exonucleasas tienen funciones totalmente diferentes en la replicación. Consideraremos primero la actividad exonucleasa 5′→3′.

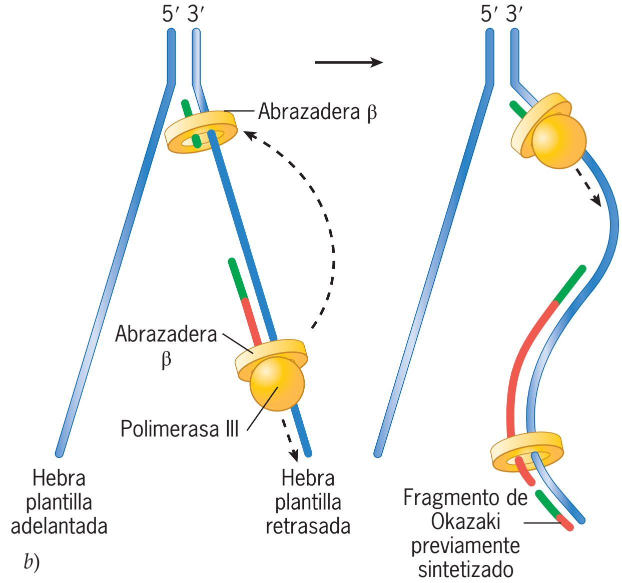
La mayoría de las nucleasas son específicas tanto para el DNA como para el RNA, pero la exonucleasa 5′→3′ de la DNA polimerasa I puede degradar cualquier tipo de ácido nucleico. La iniciación de los fragmentos de Okazaki por la primasa deja un tramo de RNA en el extremo 5′ de cada fragmento (véase el RNA primario #1 de la figura 13-13*b*), que se elimina mediante la actividad exonucleasa de 5′→3′ de la DNA polimerasa I (obsérvese figura 13-16*a*). A medida que la enzima elimina los ribonucleótidos del primario, su actividad polimerasa llena simultáneamente el espacio resultante con desoxirribonucleótidos. El último desoxirribonucleótido que se incorpora se une luego covalentemente al extremo 5′ del fragmento de DNA sintetizado previamente mediante DNA ligasa. La función de la actividad de la exonucleasa 3′→5′ será evidente en la siguiente sección.

### Garantía de alta fidelidad durante la replicación de DNA

La supervivencia de un organismo depende de la duplicación precisa del genoma. Un error cometido en la síntesis de una molécula de RNA mensajero por una RNA polimerasa da como resultado la síntesis de proteínas defectuosas, pero una molécula de



a)




b)



c)

**FIGURA 13-15 Abrazadera corrediza β y cargador de abrazadera.** *a*) Modelo de relleno de espacio que muestra las dos subunidades que forman la abrazadera corrediza con forma de rosquilla en la *E. coli*. El DNA bicatenario se muestra en azul dentro de la abrazadera. *b*) Diagrama esquemático del ciclo de la polimerasa en la hebra retrasada. La polimerasa se mantiene en el DNA mediante la abrazadera corrediza a medida que se mueve a lo largo de la hebra plantilla y sintetiza la hebra complementaria. Después de la finalización del fragmento de Okazaki, la enzima se desengancha de su abrazadera β y los cicla hacia una abrazadera ensamblada recientemente "en espera" de una unión corriente arriba RNA primario-DNA plantilla. La abrazadera β original se deja atrás durante un periodo en el fragmento de Okazaki terminado, pero finalmente se desmonta y se reutiliza. *c*) Un modelo de un complejo entre una abrazadera corrediza y un cargador de abrazadera de un procariota arcaico basado en el análisis de imágenes microscópicas electrónicas. El cargador de abrazadera (que se muestra con las subunidades roja y verde) está unido a la abrazadera corrediza (azul), que se mantiene en una conformación espiral abierta que se asemeja a una arandela de seguridad. El DNA se ha presionado a través del espacio en la abrazadera. La hebra de DNA primario termina dentro del cargador de abrazadera, mientras que la hebra plantilla se extiende a través de una abertura en la parte superior de la proteína. El cargador de abrazadera se ha descrito como un "tapón de rosca" que se ajusta al DNA de tal manera que los subdominios de la proteína forman una espiral que puede enroscarse en la estructura del DNA helicoidal. La reacción de carga de abrazadera se muestra en detalle en *Science* 2011;334:1675.

FUENTE: *a*) Tomada de John Kuriyan, *Cell* 1992;69:427; con el permiso de Elsevier; *b*) Tomada de P. T. Stukenberg, J. Turner y M. O'Donnell. *Cell* 1994;78:878; Cell by Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center; *c*) Tomada de T. Miyata, *et al*. *Proc Nat'l Acad Sci USA*. 2005;102: 3799, fig. 4*c*). © 2005 National Academy of Sciences, USA. Imagen proporcionada por cortesía de K. Morikawa, Osaka, Japón.

mRNA es solo una plantilla de vida corta entre una gran población de tales moléculas; por ello, el error dura poco. Por el contrario, un error cometido durante la replicación del DNA da como resultado una mutación permanente y la posible eliminación de la progenie de esa célula. En la *E. coli*, la probabilidad de que un nucleótido incorrecto se incorpore en el DNA durante la replicación y permanezca allí es de menos de $10^{-9}$, o menos de uno de cada mil millones de nucleótidos. Debido a que el genoma de la *E. coli* contiene aproximadamente $4 \times 10^6$ pares de nucleótidos, esta tasa de error corresponde a menos de una alteración de nucleótido por cada 100 ciclos de replicación. Esto representa la tasa de mutaciones espontáneas en esta bacteria. Se cree que los humanos tienen una *tasa de mutación espontánea* similar para la replicación de secuencias de codificación de proteínas.

La incorporación de un nucleótido particular en el extremo de una hebra de crecimiento depende de que el nucleósido trifosfato entrante pueda formar un par de bases aceptables con el nucleótido de la hebra plantilla (véase figura 13-8*b*). El análisis de las distancias entre los átomos y los ángulos de enlace indica que los pares de bases A-T y G-C tienen una geometría casi idéntica (es decir, tamaño y forma). Cualquier desviación de esos emparejamientos da como resultado una geometría diferente, como se muestra en la **FIGURA 13-17**. En cada sitio a lo largo de la plantilla, la DNA polimerasa debe discriminar entre cuatro precursores potenciales diferentes a medida que se mueven dentro y fuera del sitio activo. Entre los cuatro posibles trifosfatos de nucleósidos entrantes, solo uno forma un ajuste geométrico adecuado con la plantilla, produciendo un par de bases A-T o G-C que pueden caber en un bolsillo de unión dentro de la enzima. Este es solo el primer paso en el proceso de discriminación. Si la enzima "percibe" que el nucleótido entrante es correcto, se produce un cambio conformacional en el cual los "dedos" de la polimerasa giran hacia la "palma" (véase **FIGURA 13-18*a***), agarrando el nucleótido entrante. Este es un ejemplo de ajuste inducido como se discutió en la página 94. Si el par de bases recién formado exhibe una geometría inadecuada, el sitio activo no puede alcanzar la conformación requerida para la catálisis, y el nucleótido incorrecto no se incorpora. Por el contrario, si el par de bases exhibe una geometría adecuada, el nucleótido entrante se une covalentemente al extremo de la hebra en crecimiento.

En ocasiones, la polimerasa incorpora un nucleótido incorrecto, lo que da como resultado un par de bases mal apareadas, es decir, un par de bases distinto de A-T o G-C. Se estima que un apareamiento incorrecto de este tipo ocurre una vez por cada $10^5$–$10^6$ nucleótidos incorporados, una frecuencia que es $10^3$–$10^4$ veces mayor que la tasa de mutación espontánea de aproximadamente $10^{-9}$. ¿Cómo se mantiene la tasa de mutación tan baja? Parte de la respuesta se encuentra en la segunda de las dos acti-

vidades exonucleasas mencionadas anteriormente, la actividad 3′→5′ (consúltese figura 13-16*b*). Cuando se incorpora un nucleótido incorrecto por la DNA polimerasa I, la enzima se paraliza y el extremo de la hebra recién sintetizada tiene una tendencia incrementada a separarse de la plantilla y formar un término 3′ terminal de hebra simple. Cuando esto ocurre, el extremo deshilachado de la hebra recién sintetizada se dirige al sitio de exonucleasa 3′→5′ (véase figura 13-18), que elimina el nucleótido mal apareado. Este trabajo de "corrección" es una de las actividades enzimáticas más notables e ilustra la sofisticación a la que ha evolucionado la maquinaria molecular biológica. La actividad exonu-

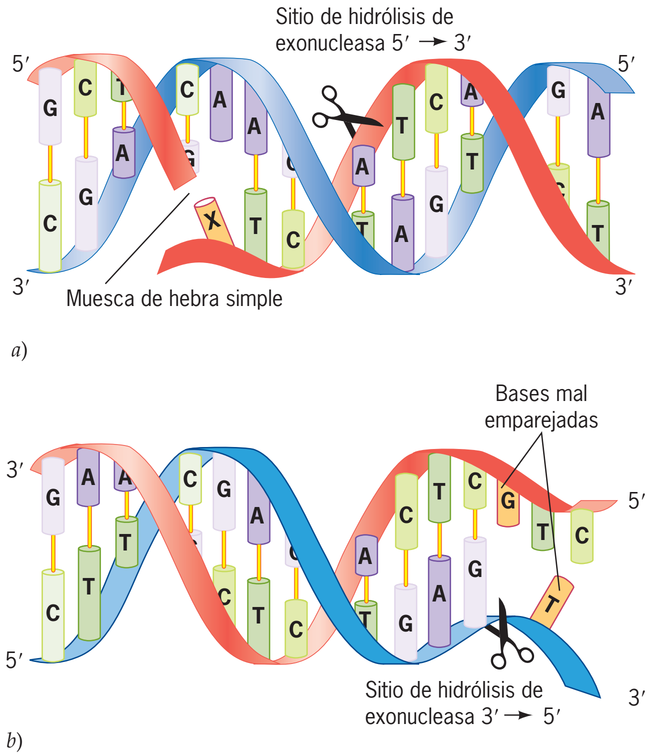



**FIGURA 13-16 Actividades exonucleasa de la DNA polimerasa I.** *a*) La función exonucleasa de 5′ → 3′ elimina los nucleótidos del extremo 5′ de una hebra simple cortada. Esta actividad también desempeña una función clave en la eliminación de los RNA primarios. *b*) La función exonucleasa 3′→5′ elimina los nucleótidos mal apareados del extremo 3′ de la hebra de DNA en crecimiento. Esta actividad realiza una función clave en el mantenimiento de la precisión de la síntesis de DNA.

FUENTE: *a-b*) Tomada de D. Voet y J. G. Voet. *Biochemistry*. 2a. ed.; Copyright © 1995, John Wiley and Sons, Inc. Reimpresa con permiso de John Wiley and Sons, Inc.

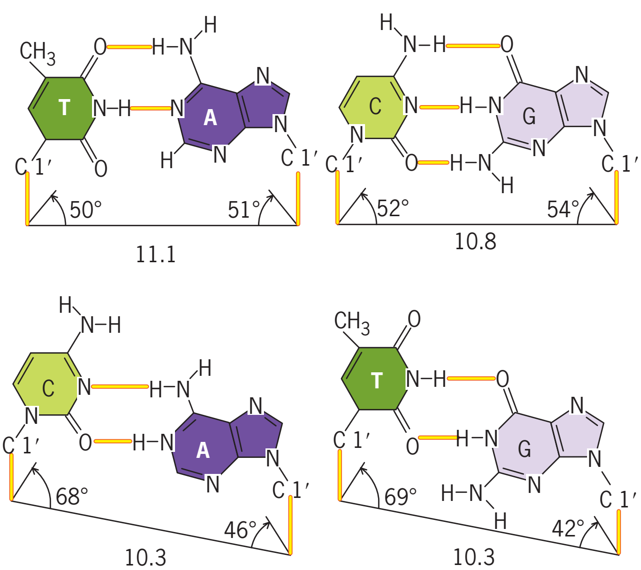



**FIGURA 13-17 Geometría de los pares de bases adecuados (parte superior) y mal emparejados (parte inferior).**

FUENTE: Tomada de *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 60 por Richardson, Charles reproducida con permiso de Annual Reviews, incorporado en el formato Republish en un libro a través de Copyright Clearance Center.

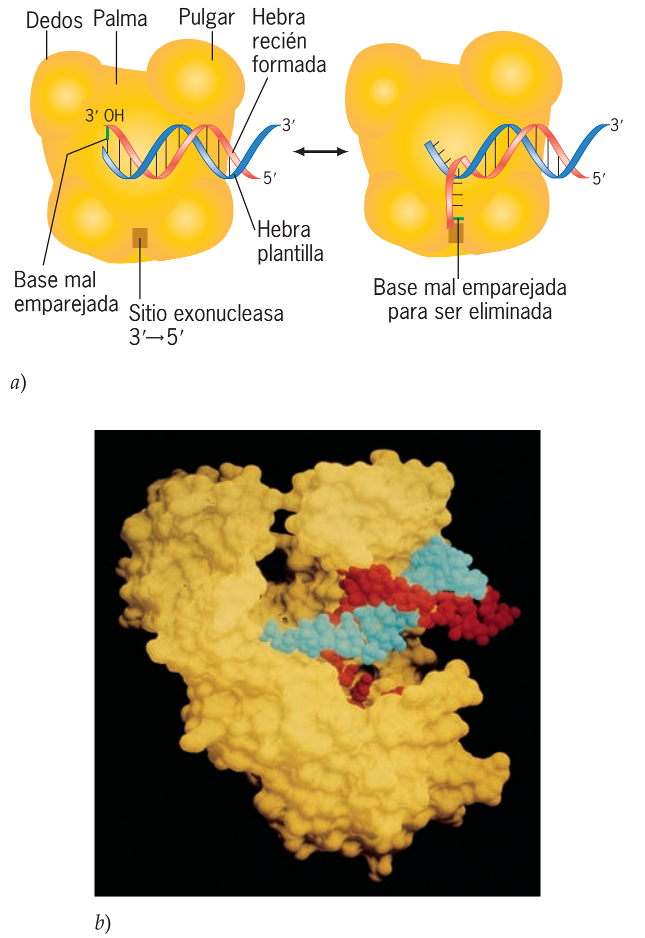



**FIGURA 13-18 Activación de la exonucleasa 3′ → 5′de la DNA polimerasa I.** *a*) Modelo esquemático de una porción de la DNA polimerasa I, conocida como fragmento de Klenow, que contiene la polimerasa y los sitios activos de exonucleasa 3′→5′. La actividad exonucleasa 5′→3′ está localizada en una porción diferente del polipéptido, que no se muestra aquí. Las regiones del fragmento Klenow a menudo se asemejan a la forma de una mano derecha parcialmente abierta, de ahí las porciones etiquetadas como "dedos", "palma" y "pulgar". El sitio catalítico para la polimerización se encuentra en el subdominio central "palma". El extremo 3′ de la hebra en crecimiento puede transportarse entre los sitios activos de la polimerasa y la exonucleasa. La adición de una base mal emparejada al extremo de la hebra en crecimiento produce un extremo 3′ deshilachado (de hebra simple) que ingresa al sitio de la exonucleasa, donde se elimina. (Los sitios de polimerasa y exonucleasa de la polimerasa III funcionan de manera similar, pero están localizados en diferentes subunidades). *b*) Modelo molecular del fragmento de Klenow en conjunto con DNA. La hebra de DNA plantilla que se copia se muestra en azul, y la hebra primaria a la que se agregarían los siguientes nucleótidos se muestra en rojo.

FUENTE: *a*) Por T. A. Baker y S. P. Bell. *Cell* 1998;92:296, tomada de un dibujo de C. M. Joyce y T. A. Steitz. Cell by Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center; *b*) Cortesía de Thomas A. Steitz, Universidad de Yale.

cleasa 3′→5′ elimina aproximadamente 99 de cada 100 bases desajustadas, lo que eleva la fidelidad a aproximadamente $10^7$–$10^8$. Además, las bacterias poseen un mecanismo llamado reparación de desapareamientos que opera después de la replicación (p. 534) y corrige casi todos los desajustes que escapan al paso de Repaso. En conjunto, estos procesos reducen la tasa de error global observada a aproximadamente $10^{-9}$. Así, la fidelidad de la replicación del DNA se puede remontar a tres actividades distintas: 1) selección precisa de nucleótidos, 2) Repaso inmediata y 3) reparación de apareamiento posterior.

Otra característica notable de la replicación bacteriana es su velocidad. La replicación de un cromosoma bacteriano completo en aproximadamente 40 minutos a 37 °C requiere que cada horquilla de replicación se mueva aproximadamente 1 000 nucleótidos por segundo, lo que es equivalente a la longitud de un fragmento completo de Okazaki. Por tanto, todo el proceso de síntesis de fragmentos de Okazaki, incluida la formación de un RNA primario, elongación del DNA y corrección simultánea por la DNA polimerasa, escisión del RNA, su reemplazo con DNA y ligadura de hebras, se produce en pocos segundos. Aunque la *E. coli* tarda aproximadamente 40 minutos en replicar su DNA, puede comenzar una nueva ronda de replicación antes de que se complete la ronda anterior. En consecuencia, cuando estas bacterias crecen a su ritmo máximo, duplican su número en aproximadamente 20 minutos.

**REPASO**

1. Describa la función de la DNA helicasa, las SSB, la abrazadera, la DNA girasa y la DNA ligasa durante la replicación en bacterias.
2. ¿En qué se diferencian las dos actividades exonucleasas de la DNA polimerasa I? ¿Cuáles son sus respectivas funciones en la replicación?
3. Describa los factores que contribuyen a la alta fidelidad de la replicación del DNA.

## 13.5 Replicación en los virus

A menudo los virus producen su propia maquinaria de replicación. El sistema de replicación del bacteriófago T4 desempeñó una función particularmente importante como sistema experimental para diseccionar los mecanismos de replicación del DNA. Algunos virus como el VIH tienen genomas basados en RNA, pero como parte de su ciclo de replicación producen una copia de DNA de su genoma utilizando la enzima transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*). Como se discutió en "Perspectiva humana" en el capítulo 3 (véase sección 3.8) la transcriptasa inversa tiene una tasa de error mucho más alta que las DNA polimerasas bacterianas o humanas. Pero debido a que la enzima es menos selectiva en los nucleótidos que incorpora, es capaz de incorporar análogos de nucleótidos en la hebra de DNA recién sintetizada. Uno de tales análogos es la azidotimidina o AZT (*azidothymidine*). La AZT se parece a la timidina, pero el grupo 3′OH se reemplaza por un grupo azida. Si la AZT se incorpora al DNA, crea un bloqueo para una mayor polimerización porque no hay 3′OH para extender la hebra. Debido a que la transcriptasa inversa puede incorporar AZT en el DNA, mientras que las polimerasas eucariotas (véase sección 13.6) no pueden, el fármaco inhibe selectivamente la síntesis de DNA mediante la transcriptasa inversa del VIH. El descubrimiento de que la AZT bloquea la transcripción reversa del VIH fue un gran avance, y llegó en un momento en que el rápido crecimiento del VIH/sida, combinado con una falta total de medicamentos para tratarlo, estaba creando una sensación de terror en la comunidad médica. La AZT se aprobó por la FDA en 1987, solo seis años después de que se reconociera el sida en Estados Unidos y después de que solo un ensayo clínico demostrara ser altamente efectivo para prevenir la muerte por infección del VIH. De hecho, fue tan efectivo que el ensayo finalizó temprano para que el medicamento pudiera aprobarse más rápidamente.

**REPASO**

1. ¿Cómo la bioquímica diferente de la transcriptasa inversa hace que los virus como el VIH sean más vulnerables a los análogos de nucleótidos?

## 13.6 Replicación del DNA en las células eucariotas

Como se señaló en el capítulo 10, las letras de nucleótidos de la secuencia del genoma humano llenarían un libro de aproximadamente un millón de páginas. Si bien cientos de investigadores tardaron varios años en secuenciar inicialmente el genoma humano, un núcleo de una sola célula de aproximadamente 10 μm de diámetro puede copiar todo este DNA en unas pocas horas. Dado el hecho de que las células eucarióticas tienen genomas grandes y una estructura cromosómica compleja, nuestra comprensión de la replicación en eucariotas ha quedado retrasada con respecto a la de las bacterias. Este desequilibrio se ha abordado mediante el desarrollo de sistemas experimentales eucariotas que son paralelos a los utilizados durante décadas para estudiar la replicación bacteriana. Éstos incluyen

- Aislamiento de levadura mutante y células animales incapaces de producir productos genéticos específicos requeridos para varios aspectos de la replicación.
- Análisis de la estructura y el mecanismo de acción de las proteínas de replicación de especies de *arqueas* (como en la figura 13-15*c*). La replicación en estos procariotas comienza en múltiples orígenes y requiere proteínas que son homólogas a las de las células eucariotas, pero son menos complejas y más fáciles de estudiar.
- Desarrollo de sistemas *in vitro* donde la replicación puede ocurrir en extractos celulares o mezclas de proteínas purificadas. El más valioso de estos sistemas ha utilizado *Xenopus*, una rana acuática que comienza su vida como un enorme huevo con todas las proteínas necesarias para llevarlo a través de una docena de rondas muy rápidas de división celular. Se pueden preparar extractos de estos huevos de rana que replicarán cualquier DNA que se le añada, independientemente de la secuencia. Los extractos de huevos de rana también apoyarán la replicación y la división mitótica de los núcleos de mamíferos, lo que ha hecho que este sea un sistema libre de células particularmente útil. Los anticuerpos pueden usarse para reducir los extractos de proteínas particulares, y la capacidad de replicación del extracto puede probarse en ausencia de la proteína afectada.

### Iniciación de la replicación en células eucariotas

La replicación en la *E. coli* comienza en solo un sitio a lo largo del cromosoma único circular (obsérvese figura 13-5). Las células de organismos superiores pueden tener mil veces más DNA que esta bacteria, pero sus polimerasas incorporan nucleótidos en el DNA a tasas mucho más lentas. Para acomodar estas diferencias, las células eucarióticas replican su genoma en pequeñas porciones, denominadas *replicones*. Cada replicón tiene su propio origen a partir del cual las horquillas de replicación avanzan hacia afuera en ambas direcciones (véase figura 13-23*a*). En una célula huma-

na, la replicación comienza en aproximadamente 10 000 a 100 000 orígenes de replicación diferentes. La existencia de replicones se demostró por primera vez en experimentos autorradiográficos en los que se demostró que las moléculas de DNA individuales se replicaban simultáneamente en varios sitios a lo largo de su longitud (véase **FIGURA 13-19**).

Aproximadamente de 10 a 15% de los replicones participan activamente en la replicación en cualquier momento dado durante la fase S del ciclo celular (consúltese figura 14-1). Los replicones localizados muy juntos en un cromosoma dado experimentan replicación simultáneamente (como se evidencia en la figura 13-19). Además, aquellos replicones activos en un momento particular durante una ronda de síntesis de DNA tienden a ser activos en un momento comparable en las rondas siguientes. En las células de mamíferos, el momento de la replicación de una región cromosómica está aproximadamente correlacionado con la actividad de los genes en la región y/o su estado de compactación. La presencia de histonas acetiladas, que están estrechamente relacionadas con la transcripción génica (p. 497), es un factor probable para determinar la replicación temprana de los *loci* genéticos activos. Las regiones más altamente compactadas y menos acetiladas del cromosoma están empaquetadas en heterocromatina (consúltese sección 12.4), y son las últimas regiones en ser replicadas. Esta diferencia en el momento de la replicación no está relacionada con la secuencia de DNA porque el cromosoma X heterocromático inactivo en las células de mamíferos hembra (p. 469) se replica tarde en la fase S, mientras que el cromosoma X eucromático activo se replica en una etapa anterior. Del mismo modo, el *locus* β globina se replica temprano durante la fase S en las células eritroides donde se expresa el gen, pero mucho más tarde en las células no eritroides donde el gen permanece en silencio.

El mecanismo por el cual se inicia la replicación en eucariotas ha sido un foco de investigación en la última década. El mayor progreso en esta área se ha realizado con la levadura en ciernes porque los orígenes de la replicación pueden eliminarse del cromosoma de levadura e insertarse en moléculas de DNA bacterianas, confiriéndoles la capacidad de replicarse dentro de una célula de levadura o en extractos celulares que contienen las proteínas de replicación eucarióticas requeridas. Debido a que estas secuencias promueven la replicación del DNA en el que están contenidas, se las denomina *secuencias de replicación autónomas* (*ARS*, *autonomous replicating sequences*). Esos ARS que se han aislado y analizado comparten varios elementos distintos. El elemento central de un ARS consiste en una secuencia conservada de 11 pares de bases, que funciona como un sitio de unión específico para un complejo multiproteico esencial llamado *complejo de reconocimiento de origen* (ORC, *origin recognition complex*) (véase **FIGURA 13-20**). Si el ARS muta de modo que no puede unir el ORC, no ocurre el inicio de la replicación.

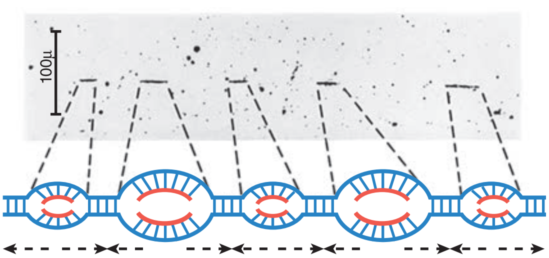



**FIGURA 13-19 Demostración experimental de que la replicación en los cromosomas eucariotas comienza en muchos sitios a lo largo del DNA.** Las células se incubaron en [$^3$H] timidina durante un breve periodo antes de la preparación de fibras de DNA para la autorradiografía. Las líneas de granos plateados negros indican sitios que habían incorporado el precursor de DNA radiactivo durante el periodo de marcado. Es evidente que la síntesis está ocurriendo en sitios separados a lo largo de la misma molécula de DNA. Como se indica en la línea que acompaña el dibujo, la iniciación comienza en el centro de cada sitio de incorporación de timidina, formando dos horquillas de replicación que se alejan de cada otro hasta que se encuentren con una horquilla vecina.

FUENTE: Cortesía de Joel Huberman.

Los orígenes de la replicación han demostrado ser más difíciles de estudiar en células de vertebrados que en levaduras. Parte del problema radica en el hecho de que prácticamente cualquier tipo de DNA purificado y desnudo es adecuado para la replicación utilizando extractos de huevos de rana. Estos estudios sugirieron que, a diferencia de la levadura, el DNA de vertebrados no posee secuencias específicas (p. ej., ARS) en las que se inicia la replicación. Sin embargo, los estudios de replicación de cromosomas de mamífero intactos *in vivo* sugieren que la replicación comienza dentro de las regiones definidas del DNA, en lugar de la selección aleatoria como ocurre en el extracto de huevo de anfibio. Se cree que una molécula de DNA contiene muchos sitios donde se *puede* iniciar la replicación del DNA, pero solo un subconjunto de estos sitios potenciales se usa realmente en un momento dado en una célula determinada. Las células que se reproducen a través de ciclos celulares más cortos, como los de los primeros embriones de anfibios, utilizan un mayor número de sitios como origen de replicación que las células con ciclos celulares más largos. Se cree que la selección real de sitios para el inicio de la replicación está regida por factores epigenéticos locales (p. 480), como la posición de los nucleosomas, los tipos de modificaciones de histonas, el estado de metilación del DNA, el grado de superenrollamiento y el nivel de la transcripción.

## Restricción de la replicación una vez por cada ciclo celular

Es esencial que cada parte del genoma se repita una vez, y solo una vez, durante cada ciclo celular. En consecuencia, debe existir algún mecanismo para evitar la reiniciación de la replicación en un sitio que ya se ha duplicado. El inicio de la replicación en un origen particular requiere el paso del origen a través de varios estados distintos. Algunos de los pasos que ocurren en un origen de replicación en una célula de levadura se ilustran en la figura 13-20. Pasos similares que requieren proteínas homólogas tienen lugar en plantas y animales, lo que indica que el mecanismo básico de iniciación de la replicación se conserva entre eucariotas.

1. En el paso 1 (consúltese figura 13-20), el origen de replicación está unido por un complejo de proteína ORC, que en las células de levadura permanece asociado con el origen a lo largo del ciclo celular. El ORC se ha descrito como una "plataforma de aterrizaje molecular" debido a su función en la unión de las proteínas requeridas en los pasos posteriores.
2. El próximo gran paso (paso 2) es el ensamblaje de un complejo proteína-DNA, llamado *complejo de prerreplicación (pre-RC, prereplication complex*), que está "autorizado" (es competente) para iniciar la replicación. Los estudios de la formación del pre-RC se han centrado en un conjunto de seis proteínas MCM relacionadas (Mcm2-Mcm7). Las proteínas MCM se cargan en el origen de replicación en una etapa tardía de la mitosis, o poco después, con la ayuda de factores accesorios que se han unido previamente al ORC. Las seis proteínas Mcm2-Mcm7 interactúan entre sí para formar un complejo hexámero (de seis miembros) en forma de anillo (el complejo MCM) que posee actividad helicasa (como en el paso 4, véase figura 13-20). La evidencia sugiere con fuerza que el complejo MCM es la helicasa replicativa eucariota; es decir, la helicasa responsable de desenrollar el DNA en la horquilla de replicación (análoga a DnaB en la *E. coli*). En la etapa pre-RC mostrada en el paso 2, cada uno de los orígenes contiene un complejo MCM *doble* hexamérico, es decir, dos helicasas replicativas completas, que permanecen inactivas en esta etapa del ciclo celular. Cada una de estas réplicas viajará en direcciones opuestas lejos del origen una vez que comience la replicación.

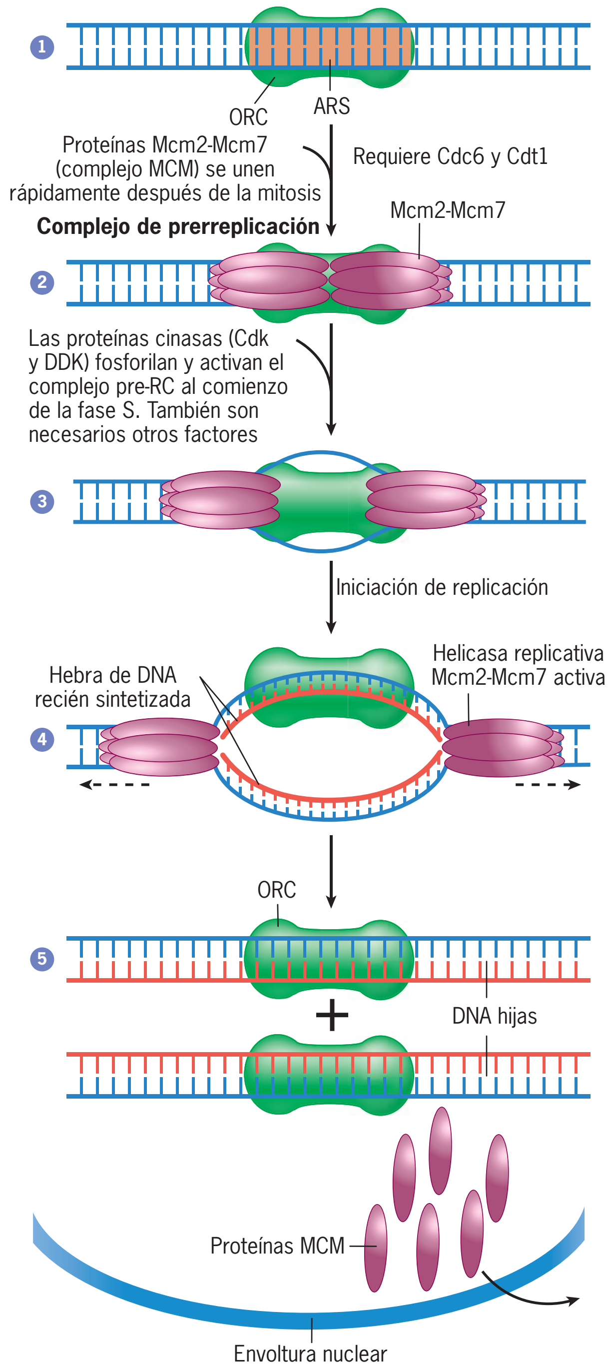



**FIGURA 13-20 Pasos que conducen a la replicación de un replicón de levadura.** Los orígenes de replicación de la levadura contienen una secuencia conservada (ARS) que se une al complejo de reconocimiento de origen multisubunidad (ORC) (paso 1). La presencia del ORC unido es necesaria para el inicio de la replicación. El ORC está ligado al origen a lo largo del ciclo celular de la levadura. En el paso 2, un complejo de seis proteínas (Mcm2-Mcm7) se une al origen durante o después de la mitosis, lo que establece un complejo de prerreplicación (pre-RC) que es competente para iniciar la replicación, dado el estímulo adecuado. La carga de proteínas MCM en el origen requiere proteínas adicionales (Cdc6 y Cdt1, que no se muestran). En el paso 3, la replicación del DNA se inicia después de la activación de una cinasa dependiente de ciclina (Cdk) y una segunda proteína cinasa (DDK). El paso 4 muestra una etapa donde la replicación ha procedido una corta distancia en ambas direcciones desde el origen. Cada complejo de MCM forma una DNA helicasa replicativa que desenrolla el DNA en una de las horquillas de replicación dirigidas de forma opuesta. Las otras proteínas requeridas para la replicación no se muestran en esta ilustración, pero se indican en la siguiente figura. En el paso 5, las dos hebras del dúplex original se han replicado, un ORC está presente en ambos orígenes, y las proteínas de replicación, que incluyen las helicasas MCM, se han desplazado del DNA. En la levadura, las proteínas MCM se exportan desde el núcleo, y la reiniciación de la replicación no puede ocurrir hasta que la célula haya pasado a través de la mitosis. [En las células de los vertebrados, varios eventos parecen prevenir la reiniciación de la replicación, incluyendo 1) la liberación del complejo ORC después de su uso en la fase S, 2) la actividad continua de la Cdk de la fase S hacia la mitosis, 3) la fosforilación de Cdc6 y su posterior exportación desde el núcleo, y 4) la degradación de Cdt1 o su inactivación por un inhibidor unido].

3. El ensamblaje de una pre-RC marca ese sitio en el genoma como un posible origen de replicación, pero no garantiza que realmente sea así. Durante la mayoría de los ciclos celulares, se ensamblan muchos más pre-RC que los que se utilizarán y no está claro qué es lo que determina cuáles de estos posibles sitios de replicación se seleccionan posteriormente. Independientemente del mecanismo de selección, justo antes del comienzo de la fase S del ciclo celular, la activación de proteínas cinasas clave conduce a la fosforilación del complejo MCM y otras proteínas y al inicio de la replicación en sitios seleccionados en el genoma (paso 3, véase figura 13-20). Una de estas proteínas cinasas es una cinasa dependiente de ciclina (Cdk, *cyclin-dependent kinase*) cuya función se discute en detalle en el capítulo 14. La actividad de la Cdk permanece alta desde la fase S hasta la mitosis, lo que suprime la formación de nuevos complejos de prerreplicación. En consecuencia, cada origen solo se puede activar una vez por ciclo celular. El cese de la actividad de la Cdk al final de la mitosis permite el ensamblaje de pre-RC para el siguiente ciclo celular.
4. Una vez que se inicia la replicación al comienzo de la fase S, la MCM helicasa se mueve con la horquilla de replicación (paso 4), aunque se debate el mecanismo de acción de esta proteína en forma de anillo. El destino de las proteínas MCM después de la replicación depende de las especies estudiadas. En las células de mamíferos, las proteínas MCM se desplazan del DNA, pero aparentemente permanecen en el núcleo. Independientemente, las proteínas MCM no pueden reasociarse con un origen de replicación que ya se ha "disparado".

## Horquilla de replicación eucariota

En general, las actividades que ocurren en las horquillas de replicación son bastante similares, independientemente del tipo de genoma que se replica, ya sea viral, bacteriano, arqueas o eucariótico. Las diversas proteínas en el "kit de herramientas" de replicación de células eucariotas se enumeran en la tabla 13-1 y se representan en la **FIGURA 13-21**. Todos los sistemas de replicación requieren helicasas, proteínas de unión a DNA de hebra simple, topoisomerasas, primasa, DNA polimerasa, abrazadera corrediza y cargador de abrazadera, y DNA ligasa. Al estudiar el inicio de la replicación eucariota *in vitro*, los investigadores a menudo combinan proteínas de replicación de mamíferos con una helicasa viral llamada *antígeno T grande*, que está codificada por el genoma de SV40. El antígeno T grande induce la separación de la hebra en el origen de replicación del SV40 y desenrolla el DNA a medida que avanza la horquilla de replicación (como en la figura 13-21*a*).

Como en las bacterias, el DNA de las células eucarióticas se sintetiza de manera semidiscontinua, aunque los fragmentos de Okazaki de la hebra retrasada son considerablemente más pequeños que en las bacterias, con un promedio de aproximadamente 150 nucleótidos de longitud. Al igual que en la *E. coli*, se cree que las hebras adelantadas y retrasadas se sintetizan de forma coordinada mediante un solo complejo replicativo o *replisoma* (consúltese figura 13-21*b*).

**TABLA 13-1 Algunas de las proteínas que se requieren para la replicación**

| Proteína de *E. coli* | Proteína eucariota | Función |
|---|---|---|
| DnaA | Proteínas ORC | Reconocimiento del origen de replicación |
| Girasa | Topoisomerasa I/II | Alivia los superenrollamientos positivos antes de la horquilla de replicación |
| DnaB | Mcm | DNA helicasa que desenrolla el dúplex original |
| DnaC | Cdc6, Cdt1 | Carga la helicasa en el DNA |
| SSB | RPA | Mantiene el DNA en estado simple |
| Complejo γ | RFC | Subunidades de la holoenzima de la DNA polimerasa que cargan la abrazadera en el DNA |
| Núcleo pol III | pol δ/ε | Enzimas de replicación primaria; sintetizar fragmentos principales de hebra y Okazaki; tener capacidad de corrección |
| β clamp | PCNA | Subunidad en forma de anillo de la holoenzima de la DNA polimerasa que bloquea la replicación de la polimerasa en el DNA; trabaja con pol III en la *E. coli* y pol δ o ε en eucariotas |
| Primasa | Primasa | Sintetiza RNA primario |
| —— | pol α | Sintetiza oligonucleótidos cortos de DNA como parte del RNA primario-DNA |
| DNA ligasa | DNA ligasa | Sella fragmentos de Okazaki en hebras continuas |
| pol I | FEN-1 | Elimina los RNA primarios; pol I de la *E. coli* también llena el espacio con el DNA |



Hasta la fecha, se han aislado cinco DNA polimerasas "clásicas" a partir de células eucariotas, y se denominan α, β, γ, δ y ε. De estas enzimas, la polimerasa γ replica el DNA mitocondrial y las funciones de la polimerasa β en la reparación del DNA. Las otras tres polimerasas tienen funciones replicativas. La polimerasa α está estrechamente asociada con la primasa, y juntas inician la síntesis de cada fragmento de Okazaki. El complejo de polimerasa α-primasa reconoce y se une al DNA desenrollado que está recubierto por una proteína de unión a DNA de hebra simple llamada RPA. La primasa inicia la síntesis mediante el ensamblaje de un RNA primario corto, que luego se amplía mediante la adición de aproximadamente 20 desoxirribonucleótidos por la polimerasa α. Se piensa que la polimerasa δ es la enzima primaria que sintetiza el DNA durante la replicación de la hebra retrasada, mientras que se piensa que la polimerasa es la enzima principal que sintetiza el DNA durante la replicación de la hebra adelantada. Al igual que la principal enzima de replicación de la *E. coli*, tanto la polimerasa δ como el 5′ requieren una "abrazadera corrediza" que ata la enzima al DNA, lo que permite que se mueva progresivamente a lo largo de una plantilla. La abrazadera corrediza de células eucariotas es muy similar en estructura y función a la abrazadera de la *E. coli* polimerasa III que se ilustra en la figura 13-15. En eucariotas, la abrazadera corrediza se llama PCNA. El cargador de abrazadera que carga PCNA en el DNA se llama RFC y es análogo al complejo de cargador de abrazadera de polimerasa III en *E. coli*. Después de sintetizar un RNA-DNA primario, la polimerasa α se reemplaza en cada unión plantilla-primario por el complejo de PCNA-polimerasa δ, que completa la síntesis del fragmento de Okazaki. Cuando la polimerasa δ alcanza el extremo 5′ del fragmento de Okazaki previamente sintetizado, la polimerasa continúa a lo largo de la hebra plantilla retrasada y desplaza al primario (que se muestra como una hoja verde en la figura 13.21*a*). El primario desplazado se corta de la hebra de DNA recién sintetizada mediante una endonucleasa (FEN-1) y la muesca resultante en el DNA se sella mediante una DNA ligasa. Se cree que FEN-1 y la DNA ligasa se reclutan en la horquilla de replicación a través de una interacción con la abrazadera corrediza PCNA. De hecho, se cree que PCNA desempeña una función importante en la orquestación de eventos que ocurren durante la replicación, reparación y recombinación del DNA.

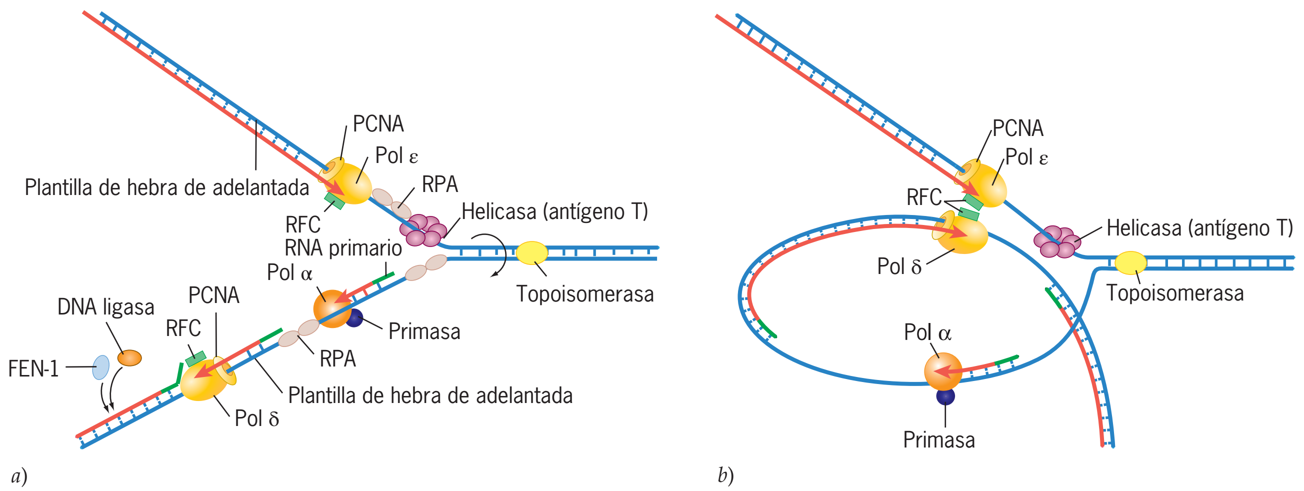



**FIGURA 13-21 Vista esquemática de los componentes principales de la horquilla de replicación eucariota.** *a*) Proteínas requeridas para la replicación eucariota. El antígeno T viral se dibuja como la helicasa replicativa en esta figura porque se emplea de forma destacada en estudios *in vitro* de replicación del DNA. Se cree que las DNA polimerasas δ y ε son las enzimas que sintetizan DNA primario de las hebras retrasadas y adelantadas, respectivamente. El PCNA actúa como abrazadera corrediza para las polimerasas δ y ε. La abrazadera corrediza se carga en el DNA mediante una proteína llamada factor de replicación C (RFC, replication factor C), que es similar en estructura y función al cargador γ de la *E. coli*. La RPA es una proteína trímera de unión a DNA de hebra simple comparable en función a la de la SSB utilizada en la replicación de la *E. coli*. Los RNA-DNA primarios de la hebra retrasada que se sintetizan mediante el complejo de polimerasa α-primasa se desplazan por el movimiento continuo de la polimerasa δ y generan un colgajo de RNA-DNA que se elimina mediante la endonucleasa FEN-1. El espacio está sellado por una DNA ligasa. Al igual que en la *E. coli*, se requiere una topoisomerasa para eliminar los superenrollamientos positivos que se desarrollan delante de la horquilla de replicación. *b*) Versión propuesta de los eventos de la horquilla de replicación que ilustra cómo las polimerasas replicativas en las plantillas principales y secundarias pueden actuar juntas como parte de un replisoma. Hasta la fecha no hay evidencia firme de que las hebras adelantadas y retrasadas se repliquen por un solo complejo replicativo como en la *E. coli*.

Debido a la capacidad de unión de un conjunto diverso de proteínas, PCNA ha sido denominado "cinturón de herramientas moleculares".

Al igual que las polimerasas bacterianas, todas las polimerasas eucariotas alargan las hebras de DNA en dirección 5′→3′ mediante la adición de nucleótidos a un grupo hidroxilo 3′, y ninguna de ellas puede iniciar la síntesis de una hebra de DNA sin un primario. Las polimerasas γ, δ y ε poseen una exonucleasa 3′→5′, cuya actividad de corrección asegura que la replicación se produzca con una precisión muy alta. Varias DNA polimerasas (que incluyen η, κ y ι) tienen una función especializada que permite a las células replicar el DNA dañado como se describe en la página 535.

## Replicación y estructura nuclear

Las horquillas de replicación que están activas en un momento determinado no se distribuyen aleatoriamente en todo el núcleo de la célula, sino que se localizan en 50 a 250 sitios, denominados **focos de replicación** (véase **FIGURA 13-22**). Se estima que cada una de las regiones púrpuras indicadas en la figura 13-22 contiene aproximadamente 10 a 100 horquillas de replicación que incorporan nucleótidos en hebras de DNA simultáneamente. La agrupación de las horquillas de replicación puede proporcionar un mecanismo para coordinar la replicación de replicones adyacentes en cromosomas individuales (como en la figura 13-19).

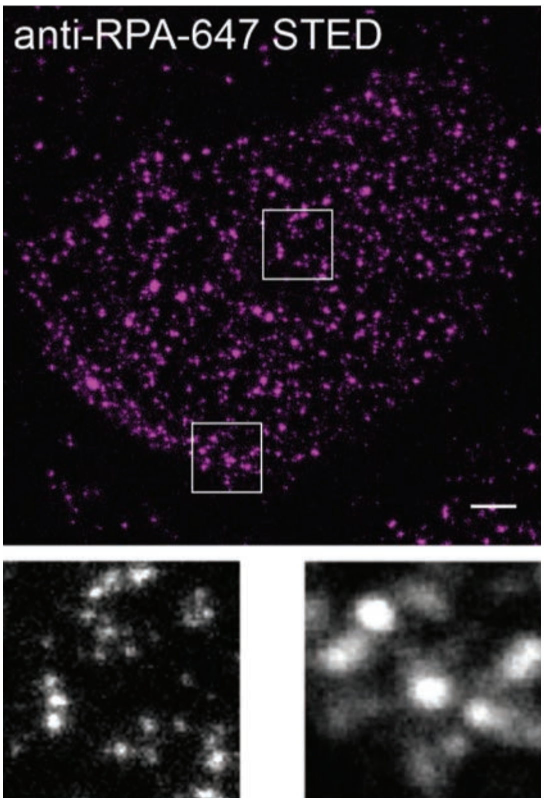



**FIGURA 13-22 Demostración de que las actividades de replicación no ocurren aleatoriamente en todo el núcleo, sino que están confinadas a sitios distintos.** Antes del inicio de la síntesis de DNA al comienzo de la fase S, varios factores necesarios para el inicio de la replicación se ensamblan en sitios discretos dentro del núcleo y forman centros de prerreplicación. Estos sitios aparecen como puntos discretos de color púrpura en la micrografía, que se ha teñido con un anticuerpo fluorescente contra el factor de replicación A (RPA, *replication factor A*), una proteína de unión al DNA de hebra simple necesaria para la replicación. Otros factores de replicación, como PCNA y el complejo polimerasa-primasa, también se localizan en estos focos. Las dos cajas delineadas se muestran con mayor aumento en los paneles inferiores. Barra de escala 2 µm.

FUENTE: De Zoltan Cseresnyes, Ulf Schwartz, y Catherine Green, *BMC Cell Biology* 2009;(10):88.

**REPASO**

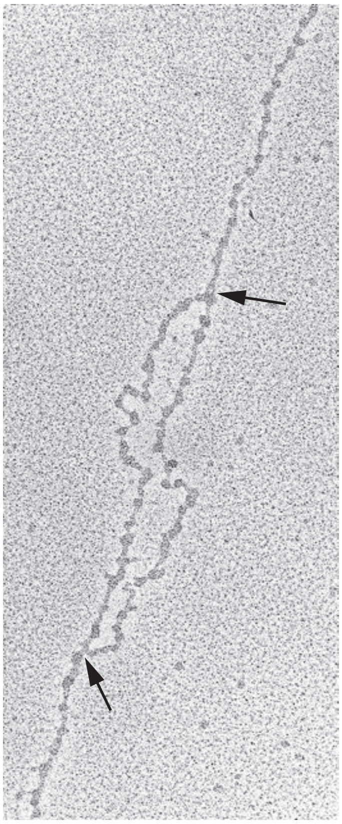
1. ¿Cuál es la principal diferencia entre bacterias y eucariotas que permite a una célula eucariota replicar su DNA en un tiempo razonable?

## 13.7 Estructura y replicación de cromatina

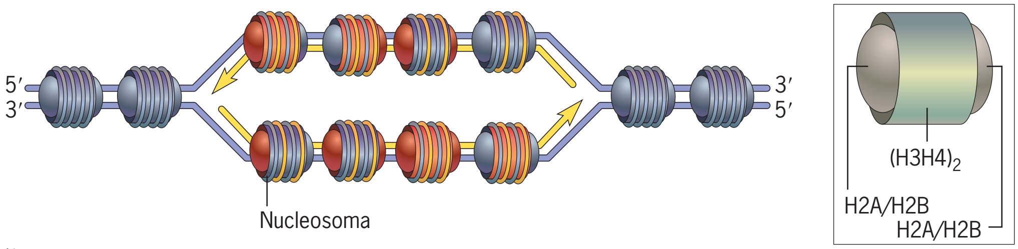
Los cromosomas de las células eucariotas consisten en DNA estrechamente complejo con matrices regulares de proteínas histonas que están presentes en forma de nucleosomas (p. 466). Se cree que el movimiento de la maquinaria de replicación a lo largo del DNA desplaza a los nucleosomas que residen en su camino. Sin embargo, el examen de una molécula de DNA replicante con el microscopio electrónico revela nucleosomas en ambas dúplex hijas muy cerca de la horquilla de replicación (consúltese figura 13-23*a*), lo que indica que el nuevo ensamblaje de los nucleosomas es un evento muy rápido.

En conjunto, los nucleosomas que se forman durante el proceso de replicación se componen de una mezcla aproximadamente equivalente de moléculas de histona que se heredan de cromosomas originales y moléculas de histona que se han sintetizado recientemente. Recuérdese, de la página 466, que el núcleo octámero de histonas de un nucleosoma consiste en un tetrámero $(H3H4)_2$ junto con un par de dímeros de H2A/H2B. La forma en que se distribuyen los nucleosomas originales durante la replicación ha sido un área de debate reciente. De acuerdo con los resultados de los experimentos clásicos, los tetrámeros $(H3H4)_2$ presentes antes de la replicación permanecen intactos y se distribuyen aleatoriamente entre las dos dúplex hijas. Como resultado, se cree que los tetrámeros viejos y nuevos $(H3H4)_2$ se entremezclan en cada molécula de DNA hija como se indica en el modelo que se muestra en la figura 13-23*b*). De acuerdo con este modelo, los dos dímeros H2A/H2B de cada nucleosoma parental no permanecen juntos a medida que la horquilla de replicación se mueve a través de la cromatina. En su lugar, los dímeros H2A/H2B de un nucleosoma se separan entre sí y se unen aleatoriamente a los tetrámeros nuevos y viejos $(H3H4)_2$ ya presentes en las dúplex hijas (obsérvese figura 13-23*b*). Los resultados de varios experimentos recientes plantean la posibilidad de otro modelo, uno en el cual el tetrámero $(H3H4)_2$ de nucleosomas parentales se divide en dos dímeros H3/H4, cada uno de los cuales puede combinarse con un dímero H3/H4 recién sintetizado para formar un tetrámero "mixto" $(H3H4)_2$, que luego se ensambla con dímeros H2A/H2B. Independientemente del patrón por el cual ocurre, el ensamblaje gradual de los nucleosomas y su espaciado ordenado a lo largo del DNA se ve facilitado por una red de proteínas accesorias. Entre estas proteínas se incluyen varias histonas chaperonas que son capaces de aceptar histonas recientemente sintetizadas o parentales y transferirlas a las hebras hijas. La mejor estudiada de estas histonas chaperonas, la CAF-1, se recluta para el avance de la horquilla de replicación a través de una interacción con la abrazadera corrediza PCNA.

En su mayor parte, las células hijas llevan a cabo el mismo patrón de transcripción que sus células originales; esta es una de las piedras angulares que subyacen al funcionamiento homeostático de los tejidos y órganos. Como se discutió en el capítulo 12, el estado transcripcional de una célula depende en gran medida del estado epigenético de la cromatina de la célula, que se hereda de una generación celular a la siguiente. La información epigenética no está codificada dentro de la secuencia de DNA de un cromosoma, sino en el patrón de residuos metilados de citosina en el DNA de una célula y en el patrón de modificaciones postraduccionales de las histonas nucleares asociadas con el DNA. En consecuencia, es esencial que estos patrones se transmitan fielmente



a)




b)

**FIGURA 13-23 Distribución de los complejos del núcleo de histona a hebras hijas después de la replicación.** *a*) Microfotografía electrónica de cromatina aislada del núcleo de un embrión de *Drosophila* de rápida escisión que muestra un par de horquillas de replicación (flechas) que se alejan una de la otra en direcciones opuestas. Entre las dos horquillas, se ven regiones de DNA recientemente replicado que ya están cubiertas por partículas de núcleo nucleosómico con la misma densidad aproximada que las hebras originales que aún no se han reproducido. *b*) Modelo esquemático que muestra la distribución de histonas centrales después de la replicación del DNA. Se muestra esquemáticamente que cada partícula central de nucleosoma está compuesta de un tetrámero central $(H3H4)_2$ flanqueado por dos dímeros de H2A/H2B. Las histonas que estaban en los nucleosomas parentales antes de la replicación están indicadas en azul; las histonas recién sintetizadas se indican en rojo. De acuerdo con este modelo, que está respaldado por un cuerpo de evidencia experimental, los tetrámeros parentales $(H3H4)_2$ permanecen intactos y se distribuyen aleatoriamente a ambas hijas dúplex. Por el contrario, los pares de dímeros H2A/H2B presentes en los nucleosomas parentales se separan y se recombinan aleatoriamente con los tetrámeros $(H3H4)_2$ en las hijas dúplex. Se han presentado otros modelos en los cuales el tetrámero parental $(H3H4)_2$ se divide a la mitad por una histona chaperona, y los dos dímeros H3/H4 resultantes se distribuyen en diferentes hebras de DNA (discutido en *Cell* 2010;140:183, y *Nature Revs. Gen*. 2010;11:285).

FUENTE: *a*) Cortesía de Steven L. Mcknight y Oscar L. Miller, Jr.

desde la cromatina original a la cromatina de las células hijas, aunque se sabe muy poco acerca de cómo se produce dicha transmisión.

Como se observó en la página 500, los patrones de metilación del DNA aparentemente se transmiten a través de las actividades de la DNA metiltransferasa DNMT1. De alguna manera, esta enzima parece capaz de agregar grupos metilo a los residuos de citosina de hebras de DNA recién sintetizadas usando el patrón de tales modificaciones en las hebras de DNA parentales como guía o plantilla. La transmisión de las modificaciones de las histonas es probablemente un desafío mucho más complejo para la célula debido al hecho de que hay un gran número de tipos diferentes de tales modificaciones, así como un número de diferentes residuos de histonas que pueden modificarse. Si las histonas "antiguas" y "nuevas" se transmiten aleatoriamente de la cromatina original a la hija como se muestra en la figura 13-23, es probable que la transmisión de modificaciones de histonas se produzca por un mecanismo muy diferente al de la transmisión de patrones de metilación del DNA. Es probable, por ejemplo, que las modificaciones presentes en las histonas viejas guiarán la modificación de nuevas histonas dentro de nucleosomas vecinos en la misma hebra de DNA. En el esquema que es más simple de imaginar, cada tipo particular de marca, como un residuo H3K9 trimetilado o un residuo H4K12 acetilado, es parte de un ciclo de retroalimentación positiva que causa que la modificación se copie a las histonas de un nucleosoma adyacente. Este tipo de mecanismo es básicamente similar al que se muestra en la figura 12-21, que describe un esquema para la propagación de la heterocromatina. De acuerdo con este escenario, una modificación de histona particular (p. ej., H3K9me) serviría como un sitio de unión específico para una proteína (p. ej., HP1) que a su vez reclutaría una enzima (p. ej., SUV39H1) que catalizaría la misma modificación (es decir, H3K9me) en una molécula de histona adyacente. Queda por ver si estas ideas resistirán el escrutinio experimental.

**REPASO**

1. ¿Cuál es la función de CAF-1 en la reconstrucción de la cromatina después de la replicación del DNA?

## 13.8 Reparación del DNA

La vida en la Tierra está sujeta a un implacable ataque de fuerzas destructivas que se originan en los ambientes internos y externos de un organismo. De todas las moléculas en una célula, el DNA se coloca en la posición más precaria. Por un lado, es esencial que la información genética permanezca casi invariable a medida que se transmite de una célula a otra, y de un individuo a otro. Por otro lado, el DNA es una de las moléculas en una célula más susceptibles al daño ambiental. Cuando se impacta por radiación ionizante, la columna vertebral de una molécula de DNA con frecuencia se rompe; cuando se exponen a una variedad de sustancias químicas reactivas, muchas de las cuales se producen por el propio metabolismo de la célula, las bases de una molécula del DNA pueden alterarse de forma estructural; cuando se someten a la radiación ultravioleta, las pirimidinas adyacentes en una hebra de DNA tienen una tendencia a interactuar entre sí para formar un complejo covalente, es decir, un dímero (consúltese **FIGURA 13-24**). Incluso la absorción de la energía térmica generada por el metabolismo es suficiente para separar las bases de adenina y guanina de su unión a los azúcares de la columna vertebral del DNA. La magnitud de estas alteraciones espontáneas, o *lesiones*, puede apreciarse a partir de la estimación de que cada célula de un mamífero de sangre caliente ¡pierde aproximadamente 10 000 bases por día! El fallo en reparar tales lesiones produce alteraciones permanentes o mutaciones en el DNA. Si la muta-

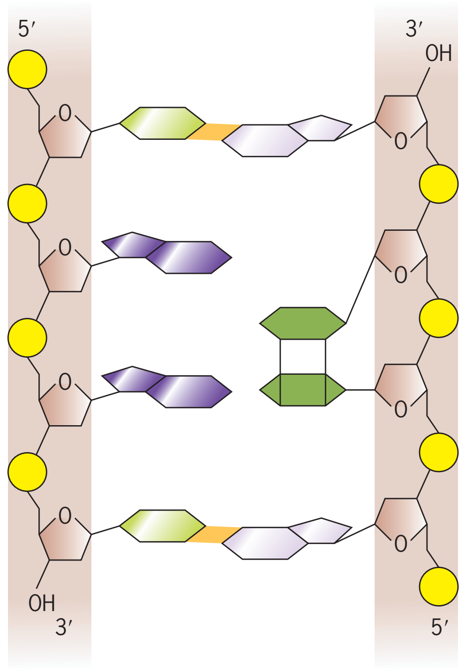



**FIGURA 13-24 Un dímero de pirimidina que se ha formado dentro de un DNA dúplex después de la irradiación UV.**

ción ocurre en una célula destinada a convertirse en un gameto, la alteración genética puede transmitirse a la siguiente generación. Las mutaciones también tienen efectos en las células somáticas (es decir, las células que no están en la línea germinal): pueden interferir con la transcripción y la replicación, conducir a la transformación maligna de una célula o acelerar el proceso por el cual un organismo envejece.

Teniendo en cuenta las consecuencias potencialmente drásticas de las alteraciones en las moléculas de DNA y la alta frecuencia con la que ocurren, es esencial que las células posean mecanismos para reparar el daño del DNA. De hecho, las células tienen un arsenal desconcertante de sistemas de reparación que corrige prácticamente cualquier tipo de daño al que una molécula de DNA es vulnerable. Se estima que menos de un cambio de base en miles escapa de los sistemas de reparación de una célula. La existencia de estos sistemas proporciona un excelente ejemplo de los mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis celular. La importancia de la reparación del DNA se puede apreciar examinando los efectos en los humanos, que resultan de las deficiencias de reparación del DNA, un tema tratado en "Perspectiva humana" en la sección 13.10.

Tanto las células procariotas como las eucariotas poseen una variedad de proteínas que vigilan vastos tramos del DNA, en busca de sutiles modificaciones químicas o distorsiones del DNA dúplex. En algunos casos, el daño puede repararse de manera directa. Los seres humanos, por ejemplo, poseen enzimas que pueden reparar de forma directa el daño de los agentes alquilantes productores de cáncer. Sin embargo, la mayoría de los sistemas de reparación requieren que *se excinda* una sección dañada de DNA, es decir, que se elimine de manera selectiva. Una de las grandes virtudes del DNA dúplex es que cada hebra contiene la información requerida para construir su pareja. En consecuencia, si uno o más nucleótidos se eliminan de una hebra, la hebra complementaria puede servir como una plantilla para la construcción del dúplex. La reparación del daño del DNA en las células eucariotas se complica por la relativa inaccesibilidad del DNA dentro de las fibras de cromatina plegadas al núcleo. Como en el caso de la transcripción, la reparación del DNA implica la participación de máquinas de remodelación de cromatina, como las enzimas modificadoras de histonas y los complejos de remodelación de nucleosomas discutidos en las páginas 497-499. Aunque es importante en la reparación del DNA, las funciones de estas proteínas no serán consideradas en la siguiente discusión.

## Reparación por escisión de nucleótidos

La **reparación por escisión de nucleótidos** (**NER**, *nucleotide excision repair*) funciona mediante un mecanismo de corte y parche, el cual elimina una variedad de lesiones voluminosas, incluyendo los dímeros de pirimidina y los nucleótidos a los que se han unido diversos grupos químicos. Se pueden distinguir dos vías NER distintas:

1. Una *vía acoplada a transcripción* en la que las hebras plantillas de genes que se transcriben de forma activa se reparan de manera preferente. Se cree que la reparación de una hebra plantilla se produce a medida que se transcribe el DNA, y la presencia de la lesión puede ser señalizada por una RNA polimerasa estancada. Esta vía de reparación preferencial asegura que aquellos genes de mayor importancia para la célula, que son los genes que la célula transcribe activamente, reciben la más alta prioridad en la "lista de reparación".
2. Una *vía genómica global* más lenta y menos eficiente que corrige las hebras de DNA en el resto del genoma.

Aunque el reconocimiento de la lesión se realice probablemente por diferentes proteínas en las dos vías NER (paso 1, véase **FIGURA 13-25**), los pasos que ocurren durante la reparación de la lesión se consideran muy similares, como se indica en los pasos del 2 al 6 de la figura 13-25. Uno de los componentes clave de la maquinaria de reparación NER es la TFIIH, una gran proteína que también participa en el inicio de la transcripción. El descubrimiento de la participación de la TFIIH estableció un vínculo crucial entre la transcripción y la reparación del DNA, dos procesos que previamente se suponía que eran independientes entre sí. Se incluyen entre las diversas subunidades de TFIIH dos subunidades (XPB y XPD) que poseen actividad helicasa; estas enzimas separan las dos hebras del dúplex (paso 2, véase figura 13-25) en la preparación para la eliminación de la lesión. La hebra dañada se corta a ambos lados de la lesión mediante un par de endonucleasas (paso 3), y se libera el segmento de DNA entre las incisiones (paso 4). Una vez extirpado, el espacio se llena con una DNA polimerasa (paso 5), y la hebra se sella mediante la DNA ligasa (paso 6).

## Reparación por escisión de base

Un sistema de reparación de escisión por separado funciona para eliminar los nucleótidos alterados, generados por productos químicos reactivos, presentes en la dieta o producidos por el metabolismo. Los pasos en esta vía de reparación en las eucariotas, que se llama **reparación por escisión de base** (**BER**, *base excision repair*), se muestran en la **FIGURA 13-26**. La BER se inicia por una *DNA glicosilasa* que reconoce la alteración (paso 1, véase figura 13-26) y elimina la base alterada por escisión del enlace glucosídico que contiene la base al azúcar desoxirribosa (paso 2). Se han identificado varias DNA glicosilasas diferentes, cada una más o menos específica para un tipo particular de base alterada, incluido el uracilo (formado por la eliminación hidrolítica del grupo amino de la citosina), la 8-oxoguanina (causada por el daño de los radicales libres del oxígeno, p. 34) y la 3-metiladenina (producida por la transferencia de un grupo metilo de un donador de metilo, p. 414).

Los estudios estructurales de la DNA glucosilasa que elimina la 8-oxoguanina altamente mutagénica (oxoG, *8-oxoguanine*) indican que esta enzima se difunde de forma rápida a lo largo del DNA "inspeccionando" cada uno de los pares de bases G-C den-

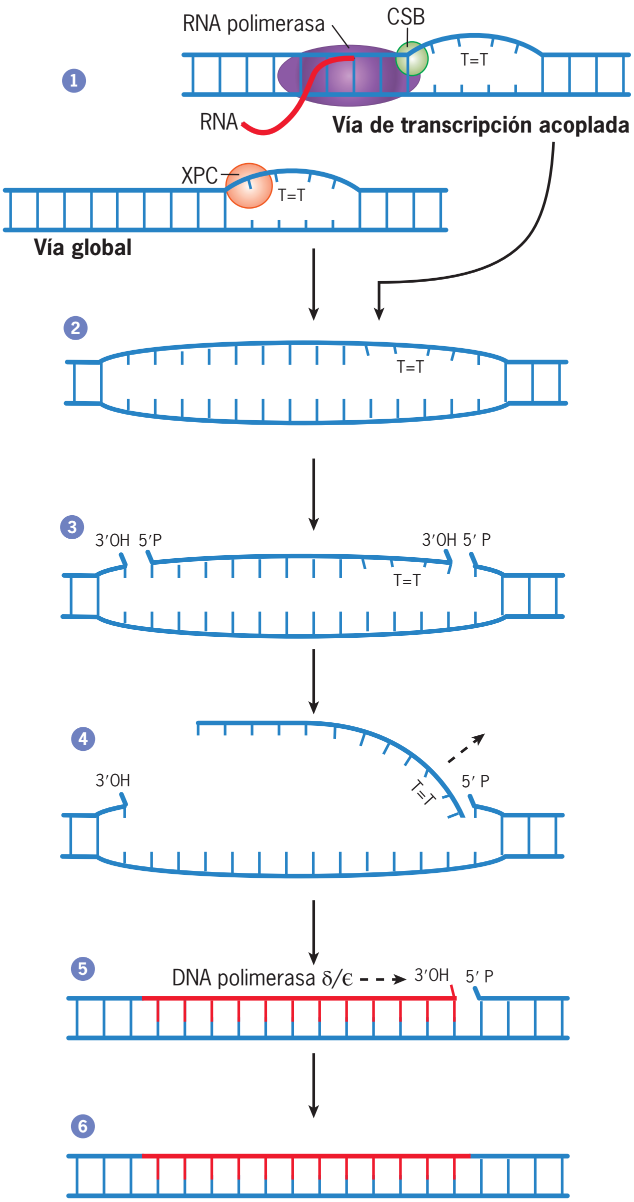



**FIGURA 13-25 Reparación por escisión de nucleótidos.** Los siguientes pasos se describen en el dibujo y se discuten en el texto: 1) El reconocimiento del daño en la vía global está mediado por un complejo de proteínas que contiene XPC, mientras que el reconocimiento del daño en la vía de transcripción acoplada se cree que está mediado por una RNA polimerasa estancada junto con una proteína CSB; 2) separación de hebras de DNA (por proteínas XPB y XPD, dos subunidades helicasas de TFIIH); 3) incisión (por XPG en el lado 3′ y el complejo XPF-ERCC1 en el lado 5′); 4) escisión; 5) síntesis de reparación del DNA (por DNA polimerasa δ y/o ε), y 6) ligadura (por DNA ligasa I).

tro del DNA dúplex (véase **FIGURA 13-27**, paso 1). En el paso 2, la enzima se encontró con un par de bases oxoG-C. Cuando esto ocurre, la enzima inserta una hebra lateral de aminoácidos específica en la hélice del DNA, que provoca que el nucleótido rote ("voltee") 180° fuera de la hélice del DNA y hacia el cuerpo de la enzima (paso 2). De hecho, si el nucleótido contiene un oxoG, la base se ajusta en el sitio activo de la enzima (paso 3) y se escinde de su azúcar asociado. Por el contrario, si el nucleótido extruido contiene una guanina normal, que solo difiere de la oxoG en estructura por dos átomos, no puede fijarse en el sitio activo de la enzima (paso 4) y se devuelve a su posición apropiada dentro de la pila de bases. Una vez que una glicosilasa elimina una purina o pirimidina alterada, el remante "decapitado" del fosfato de

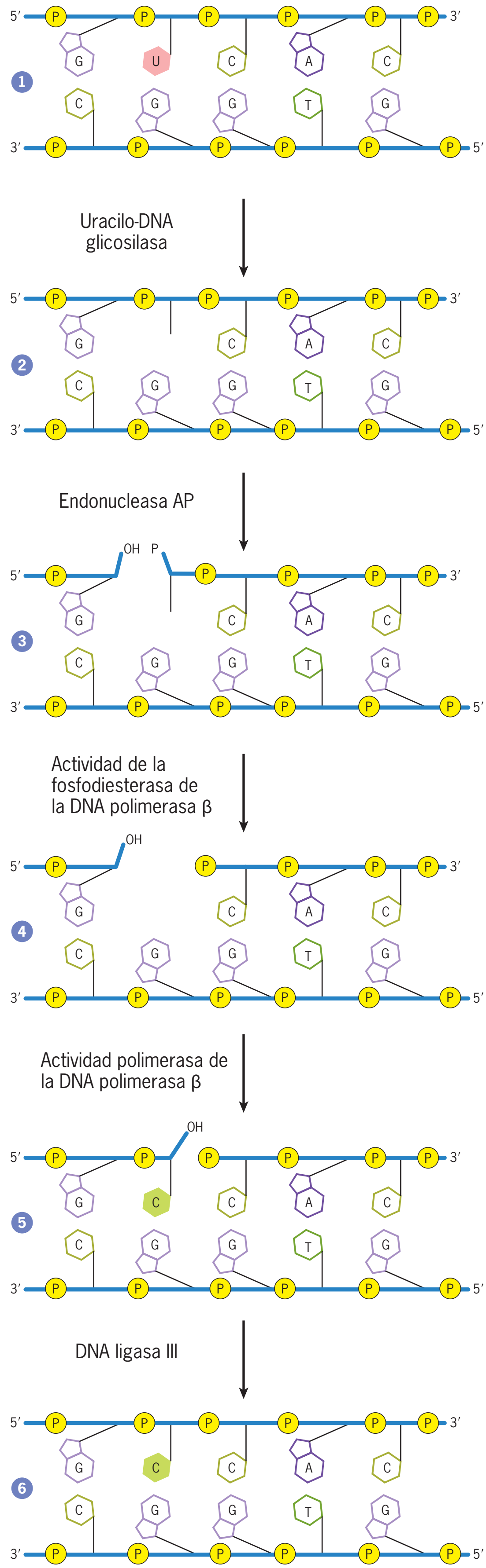



**FIGURA 13-26 Reparación por escisión de base.** Los pasos se describen en el texto. Se conocen otras vías para la BER, y también se ha demostrado que la BER tiene distintas vías de reparación globales y vías acopladas a la transcripción.

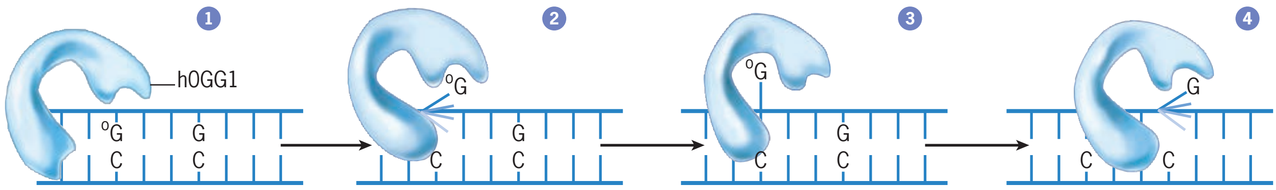



**FIGURA 13-27 Detección de bases dañadas durante la BER.** En el paso 1, una DNA glicosilasa (llamada hOGG1) está inspeccionando un nucleótido que está emparejado con una citosina. En la etapa 2, el nucleótido rota fuera del DNA dúplex. En este caso, la base es una versión oxidada de guanina, 8-oxoguanina, y es capaz de fijarse en el sitio activo de la enzima (paso 3) donde se escinde del azúcar adherido. Los siguientes pasos en BER se muestran en la figura 13-26. En el paso 4, la base extruida es una guanina normal, la cual no puede fijarse en el sitio activo de la glicosilasa y se devuelve a la pila base. La falla para eliminar oxoG hubiera resultado en una mutación G-a-T.

FUENTE: Basada en S. S. David, con permiso de *Nature* 2005;434:569. Nature by Nature Publishing Group. Reproducida con el permiso de Nature Publishing Group en formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.



desoxirribosa que queda en el sitio se escinde mediante la acción combinada de una endonucleasa especializada (AP) y una DNA polimerasa. La endonucleasa AP escinde la columna vertebral del DNA (consúltese figura 13-26, paso 3) y una actividad fosfodiesterasa de la polimerasa β que elimina el remanente azúcar-fosfato que se había unido a la base escindida (paso 4). Entonces, la polimerasa β rellena el espacio insertando un nucleótido complementario a la hebra no dañada (paso 5), y la hebra se sella mediante la DNA ligasa III (paso 6).

El hecho de que la citosina se pueda convertir en uracilo puede explicar por qué la selección natural favoreció el uso de la timina, en lugar del uracilo como una base en el DNA, aunque el uracilo estaba presumiblemente presente en el RNA cuando sirvió como material genético durante la evolución temprana de la vida (p. 429). Si el uracilo se hubiera retenido como una base de DNA, habría causado dificultades para que los sistemas de reparación distinguieran entre un uracilo que "pertenecía" a un sitio particular y uno que resultaba de una alteración de la citosina.

## Reparación del mal emparejamiento

Anteriormente se observó que las células pueden eliminar las bases mal emparejadas que son incorporadas por la DNA polimerasa y escapan a la exonucleasa de corrección de la enzima. Este proceso se denomina **reparación de desajuste** (**MMR**, *mismatch repair*). Un par de bases mal emparejadas causa una distorsión en la geometría de la doble hélice que puede ser reconocida por una enzima reparadora. Pero, ¿cómo la enzima "reconoce" qué miembro del par mal emparejado es el nucleótido incorrecto? Si se fuera a eliminar uno de los nucleótidos al azar, tomaría la decisión equivocada 50% de las veces, lo que crearía una mutación permanente en ese sitio. Por ello, para que un mal emparejamiento sea reparado después de que la DNA polimerasa haya pasado un sitio, es importante que el sistema de reparación distinga la hebra recién sintetizada, que contiene el nucleótido incorrecto, de la hebra parental, la cual contiene el nucleótido correcto. En la *E. coli*, las dos hebras se distinguen por la presencia de residuos de adenosina metilada en la hebra parental. La metilación del DNA no parece ser utilizada por el sistema MMR en las eucariotas, y el mecanismo de identificación de la hebra recién sintetizada sigue sin estar claro. Se han identificado varias vías diferentes de MMR y no se discutirán.

## Reparación de ruptura de la doble hebra

Los rayos X, los rayos gamma y las partículas liberadas por los átomos radiactivos se describen todos como *radiación ionizante* porque generan iones a medida que pasan a través de la materia. Millones de rayos gamma pasan por nuestros cuerpos a cada minuto. Cuando estas formas de radiación colisionan con una molécula frágil de DNA, a menudo rompen ambas hebras de la doble hélice. Las **rupturas de la doble hebra** (**DSB**, *double-strand breaks*) también pueden ser causadas por ciertos químicos, incluidos varios utilizados en la quimioterapia contra el cáncer (p. ej., la bleomicina), y los radicales libres producidos por el metabolismo celular normal (p. 34). Las DSB también se introducen durante la replicación del DNA dañado. Una sola ruptura de la doble hebra puede causar anomalías cromosómicas graves, que pueden tener severas consecuencias para la célula. Las DSB se pueden reparar mediante varias vías alternativas. La vía predominante en las células de mamíferos se denomina *unión de extremos no homólogos* (NHEJ, *nonhomologous end joining*), en la que un complejo de proteínas se une a los extremos rotos del DNA dúplex y cataliza una serie de reacciones que vuelven a unir a las hebras rotas. Los principales pasos que ocurren durante la NHEJ se muestran en la **FIGURA 13-28*a*)** y se describen en la leyenda que lo acompaña. En la figura 13-28*b*) se detalla el núcleo de un fibroblasto humano que se había tratado con láser para inducir un grupo localizado de rupturas de doble hebra y luego se tiñó para detectar la presencia de la proteína Ku en diversos momentos después del tratamiento con láser. Se observa que esta proteína de reparación de NHEJ se localiza en el sitio de las DSB inmediatamente después de su aparición.

Otra vía de reparación de la DSB conocida como *recombinación homóloga* (HR, *homologous recombination*) requiere un cromosoma homólogo para servir como plantilla para la reparación de la hebra rota. Los pasos que se producen durante la recombinación homóloga, que incluyen la escisión del DNA dañado, son similares a los de la recombinación genética representada en la figura 14-47. Una comparación entre estas dos vías de reparación de DSB muestra diferencias importantes. La recombinación homóloga es una vía más precisa, es decir, hay menos errores en la secuencia de bases del DNA reparado que en la NHEJ. Sin embargo, debido a que requiere que un cromosoma homólogo esté presente en el núcleo, la HR solo puede emplearse durante el ciclo celular después de la replicación del DNA (es decir, durante la fase tardía S o $G_2$). Los defectos en ambas vías de reparación se han relacionado con una mayor susceptibilidad al cáncer. Por ejemplo, la proteína BRCA1 es parte de la vía de reparación homóloga y, como se discutió en el capítulo inicial, las mutaciones heredadas en el gen *BRCA1* aumentan el riesgo de cáncer de mama.

### REPASO

1. Contraste los eventos de reparación por escisión de nucleótidos y la reparación por escisión de base.
2. ¿Por qué es importante en la reparación del desajuste que la célula distinga las hebras parentales de las hebras recién sintetizadas?

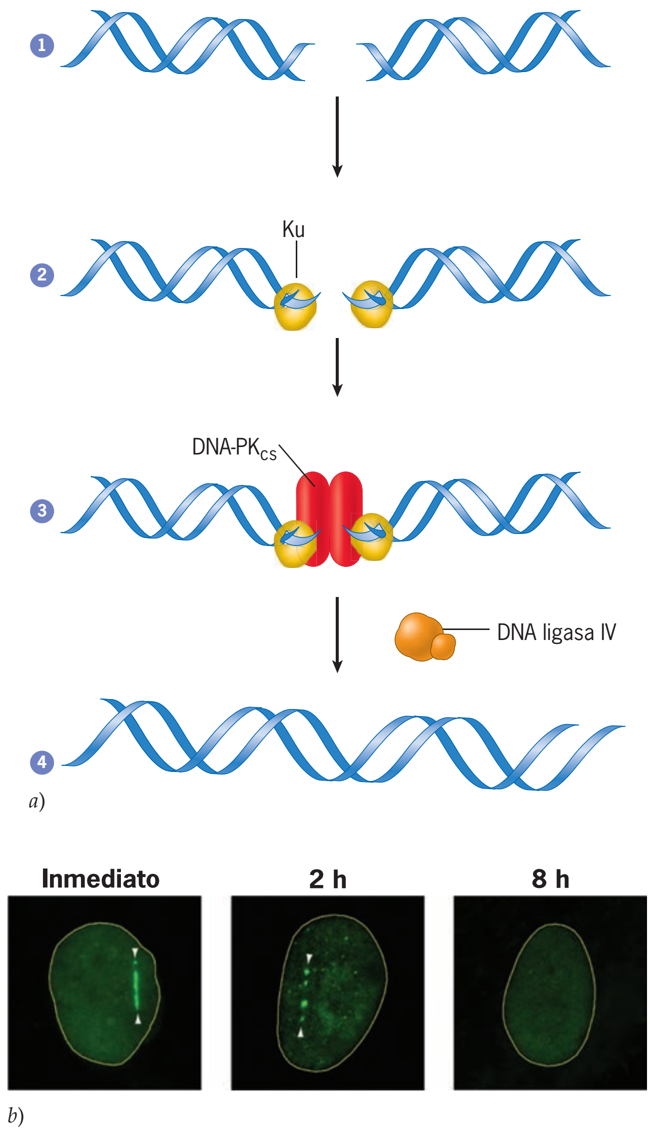



**FIGURA 13-28 Reparación de rupturas de la doble hebra (DSB) por unión de extremos no homólogos (NHEJ).** *a*) En este modelo simplificado de reparación de la ruptura de la doble hebra, la lesión (paso 1) se detecta por una proteína heterodímera con forma de anillo llamada Ku que se une a los extremos rotos del DNA (paso 2). La Ku unida al DNA recluta otra proteína, llamada DNA-PK$_{cs}$, la cual es la subunidad catalítica de una proteína-cinasa dependiente de DNA (paso 3). La mayoría de los sustratos fosforilados por esta proteína cinasa no han sido identificados. Estas proteínas unen los extremos del DNA roto de tal manera que se pueden unir mediante la DNA ligasa IV para regenerar un DNA dúplex intacto (paso 4). La vía NHEJ también puede implicar las actividades de nucleasas y polimerasas (no mostradas) y es más propensa a errores que la vía de recombinación homóloga de la reparación de DSB. *b*) Análisis del curso temporal de la localización de Ku en sitios de formación de DSB inducida por irradiación con haz de rayos láser en un sitio indicado por las puntas de flecha. La proteína Ku de NHEJ se localiza en el sitio de daño inmediatamente después de la irradiación, pero permanece allí de forma breve a medida que el daño se repara presumiblemente. Se tomaron micrografías 1) inmediatamente, 2) 2 horas después y 3) 8 horas después de la irradiación.

FUENTE: *b*) Tomada de Jong-Soo Kim, *et al. J Cell Biol* 2005;170:344, fig. 3, reproducida con permiso de la Rockefeller University Press.

## 13.9 Entre la replicación y la reparación

En "Perspectiva humana" (consúltese sección 13.10) se describe una enfermedad hereditaria la xerodermia pigmentosa (XP, *xeroderma pigmentosum*), la cual deja a los pacientes con incapacidad para reparar ciertas lesiones causadas por la exposición a la radiación ultravioleta. Los pacientes descritos con la forma "clásica" de la XP tienen un defecto en uno de los siete genes diferentes implicados en la reparación por escisión de nucleótidos (p. 536). Estos genes se designan como *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPE*, *XPF* y *XPG*, y algunas de sus funciones en la NER se indican en la leyenda de la figura 13-25. Se identificó otro grupo de pacientes que, al igual que aquellos con XP, eran altamente susceptibles al desarrollo del cáncer de piel debido a la exposición al sol. Sin embargo, a diferencia de las células de los que padecen la XP, las células de estos pacientes eran capaces de reparar por escisión de nucleótidos y eran solo un poco más sensibles a la luz UV que las células normales. Esta mayor sensibilidad a los rayos UV se reveló durante la replicación, debido a que estas células a menudo producían hebras hijas fragmentadas después de la irradiación UV. Los pacientes en este grupo se clasificaron como que tenían una forma variante de la XP, denominada XP-V. Se volverá a la base del defecto XP-V en un momento.

Se ha visto en la sección anterior que las células pueden reparar una gran variedad de lesiones del DNA. Sin embargo, en ocasiones, una lesión del DNA no se repara para el momento en que el segmento de DNA está programado para someterse a la replicación. En estas ocasiones, la maquinaria de replicación llega al sitio del daño en la hebra plantilla y se estanca allí. Cuando esto sucede, se emite algún tipo de señal que conduce al reclutamiento de una polimerasa especializada, la cual puede eludir la lesión.[3] Supóngase que la lesión en cuestión es un dímero de timidina (consúltese figura 13-24) en una célula de la piel, que fue causada por la exposición a la radiación UV. Cuando la polimerasa replicativa (pol δ o ε) alcanza el obstáculo, la enzima se reemplaza de forma temporal por una DNA polimerasa "especializada" designada como pol η, la cual puede insertar dos residuos A en la hebra recién sintetizada a través de los dos residuos de T unidos de manera covalente como parte del dímero. Una polimerasa de derivación alternativa denominada PrimPol también puede reclutarse para polimerizar más allá de los bloques de replicación, y tiene la interesante característica de ser capaz de producir y usar un primario basado en DNA, en lugar del primario basado en RNA habitual que usan la mayoría de las polimerasas replicativas. Independientemente de qué sistema se utilice para polimerizar más allá de la lesión, una vez que se logra esta "elusión del daño", la célula vuelve a la polimerasa replicativa normal y la síntesis del DNA continúa sin dejar rastro de que se haya resuelto un problema grave. Los pacientes afectados con XP-V tienen una mutación en el gen que codifica pol η y, por tanto, tienen dificultades para replicar dímeros de timidina pasados, pero aún pueden reparar un cierto nivel de dímeros de timidina usando la polimerasa PrimPol.

Descubierta en 1999, la polimerasa η es un miembro de una familia del DNA polimerasa en la que cada miembro está especializado en la incorporación de nucleótidos opuestos a tipos particulares de lesiones del DNA en la hebra plantilla. Se señala que las polimerasas de esta familia participan en la *síntesis de translesión* (*TLS, translesion synthesis*). Los estudios cristalográficos de rayos X revelan que las polimerasas TLS tienen un sitio activo inusualmente amplio que puede acomodar físicamente nucleótidos alterados, los cuales no cabrían en el sitio activo de una polimerasa replicativa. Estas polimerasas TLS solo son capaces de incorporar de uno a unos pocos nucleótidos en una hebra de DNA (carecen de procesividad); no tienen capacidad de corrección, y es mucho más probable que incorporen un nucleótido incorrecto (es decir, no complementario) al copiar DNA no dañado que las polimerasas clásicas.

[3] Una célula tiene otras opciones para manejar una horquilla de replicación estancada, pero son más complejas y no se analizarán.

El estancamiento de las horquillas de replicación que permite reparar el daño puede ser en sí mismo una fuente de daño y alteración del genoma.

Cuando una horquilla se estanca, la helicasa puede seguir desenrollando el DNA mientras que las polimerasas se quedan atrás con la horquilla estancada, lo que crea una región de hebra simple, que luego puede romperse o cortarse por nucleasa y crear rupturas de doble hebra. Estas rupturas crean el potencial para reordenamientos genómicos cuando la célula intenta arreglar la ruptura mediante la recombinación. Tales reordenamientos del genoma han sido implicados en una variedad de enfermedades. Por ejemplo, se cree que las rupturas de doble hebra del DNA asociadas con las horquillas estancadas son una de las causas de la variación espontánea del número de copias (CNV, *copy number variation*), en la que una sección del DNA puede repetirse varias veces. La CNV está implicada en más de 20 enfermedades neurodegenerativas o del neurodesarrollo, así como en afecciones complejas como la esquizofrenia. De forma similar, la variación en el número de repeticiones de trinucleótidos discutida en el capítulo 10 también se ha propuesto como resultado del estancamiento de las horquillas de replicación causadas por estructuras inusuales del DNA formadas por las repeticiones. El mantenimiento de la integridad del genoma requiere una cuidadosa coordinación entre la replicación, la reparación y la recombinación del DNA.



**REPASO**

1. ¿Cuál es la función de la síntesis de translesión?

# 13.10 PERSPECTIVA HUMANA

## Consecuencias de las deficiencias de reparación del DNA

Le debemos nuestras vidas a la luz del sol, que proporciona la energía capturada durante la fotosíntesis. Pero el sol también emite un flujo constante de rayos ultravioleta que hace envejecer y mutar a las células de nuestra piel. Los efectos peligrosos del sol se ilustran de forma más acentuada por el raro trastorno genético recesivo, xerodermia pigmentosa (XP). Los pacientes con la XP poseen un deficiente sistema de reparación por escisión de nucleótidos que no puede eliminar los segmentos del DNA dañados por la radiación ultravioleta. Como resultado, las personas con XP son extremadamente sensibles a la luz solar; incluso la exposición muy limitada a los rayos directos del sol puede producir grandes cantidades de manchas oscuras en las áreas expuestas del cuerpo, y un riesgo enormemente alto de desarrollar cáncer mortal y la deformación de la piel.

La XP no es el único trastorno genético caracterizado por la deficiencia en la reparación por escisión de nucleótidos. El síndrome de Cockayne (CS, *Cockayne syndrome*) es un trastorno hereditario caracterizado por sensibilidad aguda a la luz, disfunción neurológica debida a la desmielinización de las neuronas, y enanismo, pero no por un aumento evidente en la frecuencia del cáncer de piel. Las células de los individuos con CS son deficientes en la vía por la que se repara el DNA activo de forma transcripcional (p. 532). El resto del genoma se repara a la velocidad normal, lo que presumiblemente justifica los niveles normales de cáncer de piel. Pero, ¿por qué las personas con un mecanismo de reparación defectuoso están sujetas a anormalidades específicas como el enanismo? La mayoría de los casos del CS se pueden encontrar con una mutación en uno de los dos genes, ya sea *CSA* o *CSB*, que se cree que están involucrados en el acoplamiento de la transcripción a la reparación del DNA (véase figura 13-25). Las mutaciones en estos genes, además de afectar la reparación del DNA, también pueden alterar la transcripción de ciertos genes, lo que conduce al retraso del crecimiento y al desarrollo anormal del sistema nervioso. Esta posibilidad se ve reforzada por el hallazgo, en casos raros, de que los síntomas del CS también pueden ocurrir en personas con XP que portan mutaciones específicas en el gen *XPD*. Como se señaló en la página 532, el *XPD* codifica una subunidad del factor de transcripción TFIIH requerido para la iniciación de la transcripción. Las mutaciones en *XPD* pueden conllevar a defectos tanto en la reparación como en la transcripción del DNA. Ciertas otras mutaciones en el gen *XPD* son responsables de otra enfermedad, la tricotiodistrofia (TTD, *trichothiodystrophy*), que también combina síntomas que sugieren defectos en la reparación del DNA y en la transcripción. Al igual que los pacientes con CS, las personas con TTD tienen una mayor sensibilidad al sol sin mayor riesgo de desarrollar cáncer. Los pacientes con TTD tienen síntomas adicionales, que incluyen cabello quebradizo y piel escamosa. Estos hallazgos indican que los defectos en un único gen pueden provocar tres trastornos distintos —XP, CS y TTD—, con el resultado particular de la enfermedad probablemente determinada por la mutación específica presente en ese gen. Los estudios estructurales de moléculas mutantes de XPD sugieren que estas diversas mutaciones afectan diferentes funciones de la proteína.

En otras partes de este texto, se describen las circunstancias que conducen al envejecimiento prematuro (o acelerado) en los seres humanos o modelos animales: como resultado de 1) aumento de los radicales libres (p. 34), 2) incremento de las mutaciones del DNA mitocondrial (p. 196) y 3) las mutaciones en una proteína de la envoltura nuclear (p. 461). En 2006, a un investigador clínico le llamó la atención un niño de 15 años, que sufría quemaduras frecuentes y ciertas características del envejecimiento prematuro. El análisis genético determinó que el niño portaba una mutación en el gen *XPF* cuya proteína codificada realiza uno de los cortes durante la vía NER (consúltese figura 13-25). Los pacientes con mutaciones leves en *XPF* desarrollan XP y tienen la NER alterada. Este individuo tenía una mutación más severa en el gen *XPF*, lo que causaba que sus células no pudieran reparar los enlaces cruzados covalentes que se forman de manera ocasional entre las dos hebras de un DNA dúplex. Los estudios en las células de este individuo, y en ratones con una mutación correspondiente, sugirieron que los enlaces cruzados no reparados conducen a un acrecentamiento de la muerte celular (apoptosis), que directa o indirectamente promueve el envejecimiento prematuro. Según una hipótesis, los defectos en los sistemas de reparación del DNA que producen principalmente una mayor tasa de mutación en las células del cuerpo, se asocian con una mayor susceptibilidad al cáncer, mientras que los defectos en los sistemas de reparación del DNA que resultan primordialmente en la muerte celular están asociados con el envejecimiento

acelerado.[1] Si cualquiera de estos síndromes de envejecimiento prematuro proporciona entendimiento de los mecanismos del envejecimiento normal sigue siendo un tema de debate.

Los individuos con trastornos de reparación del DNA no son los únicos que deberían preocuparse por la exposición al sol. Incluso en una célula de la piel cuyas enzimas de reparación están funcionando a niveles óptimos, una pequeña fracción de las lesiones no se puede extirpar y reemplazar. Las alteraciones en el DNA conducen a mutaciones que pueden causar que una célula se vuelva maligna. Por tanto, una de las consecuencias del fallo para corregir el daño inducido por UV es el riesgo de cáncer de piel. Considérense las siguientes estadísticas: más de un millón de personas desarrollan una de las tres formas de cáncer de piel cada año en Estados Unidos, y la mayoría de estos casos se atribuyen a la sobreexposición a los rayos ultravioleta del sol. Afortunadamente, las dos formas más comunes de cáncer de piel —el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas— rara vez se diseminan a otras partes del cuerpo y, por lo general, se pueden extirpar en un consultorio médico. Ambos tipos de cáncer se originan en las células epiteliales de la piel.

Sin embargo, el melanoma maligno, el tercer tipo de cáncer de piel, es un asesino potencial. A diferencia de los otros, los melanomas se desarrollan a partir de células pigmentarias (melanocitos) en la piel. El número de casos de melanoma diagnosticados en Estados Unidos está aumentando a una alarmante tasa de 4% anual debido a la cantidad cada vez mayor de personas que pasan mucho tiempo bajo el sol en las últimas décadas. Los estudios sugieren que uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar melanoma en la edad adulta es la aparición de quemaduras solares severas y ampollas cuando niño o adolescente. Las personas con mayor riesgo son los caucásicos con piel extremadamente clara. Muchos de estos individuos tienen células pigmentarias cuyas superficies carecen de un receptor funcional (denominado MC1R) para una hormona secretada por las células epiteliales cercanas de la piel, en respuesta a la radiación ultravioleta. Los melanocitos responden a la activación de MC1R por la producción del pigmento oscuro melanina, así proveen al individuo con un bronceado. La piel bronceada es más protectora de los rayos UV, que la piel clara, no bronceada, aunque la radiación UV es responsable de provocar la respuesta de bronceado. ¿Y si fuera posible desarrollar una piel bronceada sin tener que sufrir la exposición a los UV? Varios grupos de investigadores trabajan en tal enfoque con el uso de varios recursos aparte de la exposición a luz solar que contiene UV para estimular la respuesta de bronceado en células pigmentarias. Está por ver si alguno de estos enfoques resultará seguro y eficaz.

El cáncer de piel no es la única enfermedad promovida por deficiencia o sobrecarga del sistema de reparación del DNA. Se estima que hasta 15% de los casos de cáncer de colon pueden atribuirse a mutaciones en los genes que codifican las proteínas requeridas para la reparación del desajuste. Las mutaciones que paralizan el sistema de reparación del desajuste inevitablemente conducen a una tasa de mutación más alta en otros genes porque no se corrigen los errores hechos durante la réplica.

El cáncer también es una de las consecuencias de las rupturas del DNA de doble hebra, que no han sido reparadas o lo han sido de forma incorrecta. Varios agentes ambientales a los cuales estamos comúnmente expuestos, incluyendo rayos X, rayos gamma y emisiones radiactivas, pueden causar rupturas en el DNA. El riesgo ambiental más serio en este aspecto es probablemente el radón (de manera específica $^{222}$Rn), un isótopo radiactivo formado durante la desintegración del uranio. Algunas áreas del planeta contienen niveles relativamente altos de uranio en el suelo, y las casas construidas en estas regiones pueden contener niveles peligrosos del gas radón. Cuando el gas se respira en los pulmones, puede conducir a rupturas del DNA de doble hebra, que aumenta el riesgo del cáncer de pulmón. Una fracción significativa de muertes por cáncer de pulmón en los no fumadores es probablemente debido a la exposición al radón.

## Referencia

1. No ha sido mencionado en esta discusión, por varias razones, que dos de los genes responsables con más frecuencia de los síndromes del envejecimiento prematuro codifican a miembros de un tipo particular de familia DNA helicasa llamada helicasas RecQ. Los genes en cuestión son *WRN* y *BLM*, que, cuando mutan, son responsables de las enfermedades hereditarias el síndrome de Werner y el síndrome de Bloom, respectivamente, que se caracterizan tanto por el incremento de riesgo del cáncer como por rasgos de envejecimiento acelerado. Se sugiere que estas helicasas están implicadas en ciertos tipos de escisión de base y vías de reparación de la DSB. Parecen ser particularmente importantes en la solución de situaciones donde la DNA polimerasa replicativa se estanca en una lesión y las horquillas de replicación "colapsan" (desensamblan).

# Preguntas analíticas

1 Suponga que Meselson y Stahl llevaron a cabo su experimento cultivando células en un medio con $^{14}$N y luego transfirieron las células a un medio que contenía $^{15}$N. ¿Cómo habrían aparecido las bandas dentro de los tubos de la centrífuga, si la replicación fuera semiconservadora? ¿Si la replicación fuera conservadora? ¿Si la replicación fuera dispersora?

2 Suponga que aísla una cepa mutante de levadura que replica su DNA más de una vez por ciclo celular. En otras palabras, cada gen en el genoma se repitió varias veces entre divisiones celulares sucesivas. ¿Cómo podría explicar tal fenómeno?

3 ¿Cómo aparecerían los cromosomas del experimento en las células eucariotas representadas en la figura 13-4, si la replicación se produce por un mecanismo conservador o dispersor?

4 Se ha observado que las células poseen una enzima especial para eliminar el uracilo del DNA. ¿Qué supone que pasaría si los grupos de uracilo no se eliminaran? (Puede considerar la información presentada en la figura 11-42 sobre las propiedades de emparejamiento del uracilo).

5 Dibuje una molécula de DNA parcialmente bicatenaria que no serviría como plantilla para la síntesis de DNA por la DNA polimerasa I.

6 Algunos mutantes bacterianos sensibles a la temperatura detienen la replicación de forma inmediata después de la elevación de la temperatura, mientras que otros continúan replicando su DNA durante un periodo antes de que cese esta actividad, y otros continúan hasta que se complete una ronda de replicación. ¿Cómo difieren estos tres tipos de mutantes?

7 Supongamos que la tasa de error durante la replicación en células humanas fuera la misma que la de las bacterias (alrededor de $10^{-9}$). ¿Cómo afectaría esto a las dos células de manera diferente?

8 Considere una bacteria que se divide una vez cada media hora, tiene un genoma que es de $10^6$ pb, y que tiene una tasa de error para la replicación del DNA de $10^{-9}$. Si una sola célula de esta bacteria comienza a crecer en un tubo de medio de cultivo y crece durante todo un día (24 horas), ¿cuántas muta-

ciones puntuales diferentes estarán presentes de manera aproximada entre las bacterias en el tubo después de 24 horas? (Véase **video tutorial cuantitativo**).

9 En la figura 13-19 se muestran los resultados de un experimento en el que las células se incubaron con [$^3$H]timidina durante menos de 30 minutos antes de la fijación. ¿Cómo espera que aparezca esta fotografía después de un periodo de marcaje de una hora? ¿Puede usted concluir que todo el genoma se replica en una hora? Si no es así, ¿por qué no?

10 Los orígenes de la replicación tienden a tener una región muy rica en pares de bases A-T. ¿Para qué función usted supone que pueden servir estas secciones?

11 ¿Cuáles son las ventajas de la replicación que ocurre en un pequeño número de focos de replicación en lugar de en el nucleoplasma general?

12 ¿Cuáles son algunas de las razones por las que se puede esperar que las células humanas tengan sistemas de reparación más eficientes que las de una rana?

13 Supongamos que se comparan autorradiografías de dos células que habían estado expuestas a la [$^3$H]timidina, una que estaba involucrada en la replicación del DNA (fase S) y otra que no. ¿Cómo espera usted que difieran las autorradiografías de estas células?

14 Construya un modelo que explique cómo se repara el DNA transcripcionalmente activo preferentemente sobre el DNA transcripcionalmente silencioso.

# 14 CAPÍTULO

# División celular

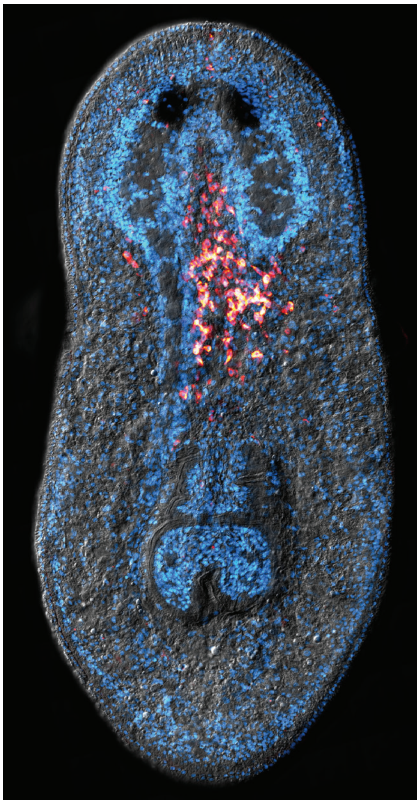
## EN BUSCA DE LA INMORTALIDAD

Cada dos meses todas las células de la superficie del cuerpo se eliminan y se reemplazan por otras. El revestimiento epitelial del intestino delgado se renueva a un ritmo aún más rápido, sustituyéndose por completo en el lapso de tres a cinco días. Al igual que la mayoría de las células de nuestro cuerpo, estas células epiteliales son terminales o posmitóticas, lo que significa que ya no se dividirán para dar lugar a nuevas células. A medida que envejecen y se deterioran por el desgaste se reemplazan continuamente a través del trabajo de las células madre (como se describe en el capítulo 1). Por el contrario, otras células en el cuerpo son demasiado longevas y no parecen ser reemplazadas en absoluto, incluidas algunas poblaciones neuronales.

Al parecer algunos organismos no poseen la capacidad de regenerar nuevas células, y nacen con todas las células que siempre tendrán. Esto incluye el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, donde se ha mapeado el papel y la ubicación de cada una de las 959 células del gusano adulto.

Por el contrario, otros organismos parecen tener células madre muy activas, dando lugar a una capacidad impresionante para regenerar extremidades, o incluso secciones más grandes de su cuerpo. Los tritones, por ejemplo, son bien conocidos por su capacidad para regenerar miembros completos. Los grupos de células madre se activan en el sitio de

(*continúa*)



Las células divisorias en un planario adulto se resaltan en naranja/rojo; los núcleos celulares son de color azul. Las células en división se derivan todas de una única célula madre pluripotente. Estas poblaciones activas de células madre proporcionan *Planaria* con notables capacidades regenerativas.
FUENTE: D Wagner, *et al*. *Science* 2011 mayo 13;(332). Portada.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**14.1** El ciclo celular
**14.2** Regulación del ciclo celular
**14.3** **VÍAS EXPERIMENTALES:** El descubrimiento y caracterización del MPF
**14.4** Control del ciclo celular: el papel de las proteínas cinasas
**14.5** Control del ciclo celular: puntos de control, inhibidores de la Cdk y respuestas celulares
**14.6** Descripción general de la fase M: mitosis y citocinesis
**14.7** Profase
**14.8** Prometafase
**14.9** Metafase
**14.10** Anafase
**14.11** Telofase y citocinesis
**14.12** Descripción general de la meiosis
**14.13** Las etapas de la meiosis
**14.14** **PERSPECTIVA HUMANA:** La no disyunción meiótica y sus consecuencias
**14.15** Recombinación genética durante la meiosis

la herida y se someten a una serie de divisiones y diferenciaciones para dar lugar a tejido nuevo como piel, músculo y vasos sanguíneos.

Tal vez la habilidad regenerativa más notable pertenece a los pequeños platelmintos del género *Planaria*. Como se ha demostrado en numerosos laboratorios de enseñanza de todo el mundo, un planario se puede cortar en rodajas y dividir en pequeños cubos, cada uno de los cuales eventualmente formará un gusano completo. La investigación ha demostrado que una masa de células madre, llamada blastema, migra a los sitios de la lesión y coordina la destrucción de los tejidos más viejos y la formación de tejido nuevo para reformar lo que se ha perdido. Se cree que el blastema "sabe" qué construir basado en un complejo sistema de señales e interacciones, que en la actualidad no se comprende bien.

Al igual que las células madre, las cancerosas también son conocidas por su capacidad de sufrir de manera acelerada numerosas divisiones, lo cual trae consigo consecuencias nefastas. Comprender los mecanismos de división celular, y cómo se regula el ciclo celular, es clave para aprovechar potencialmente el poder de la terapéutica regenerativa, así como para mantener el cáncer bajo control.



## 14.1 El ciclo celular

El proceso por el cual las células nuevas surgen de otras células vivas se llama **división celular**. Para un organismo multicelular como un ser humano o el roble, incontables divisiones de un cigoto unicelular producen un organismo de asombrosa complejidad y organización celular. La división celular no se detiene con la formación del organismo maduro, sino que continúa en ciertos tejidos durante toda la vida. Millones de células que residen en la médula de sus huesos o en el revestimiento de su tracto intestinal se están dividiendo en este momento. Esta enorme producción de células es necesaria para reemplazar las células que han envejecido o muerto.

Aunque la división celular ocurre en todos los organismos, tiene lugar de manera muy diferente en procariotas y eucariotas. Restringiremos la discusión a la versión eucariótica. Dos tipos distintos de división de células eucarióticas serán discutidos en este capítulo. La mitosis conduce a la producción de células que son genéticamente idénticas a las de su antecesora, mientras que la meiosis conduce a la producción de células con la mitad del contenido genético de la célula madre. La mitosis sirve como base para producir nuevas células, la meiosis como base para producir nuevos organismos que se reproducen sexualmente. Juntos, estos dos tipos de división celular forman los eslabones de la cadena entre los padres y sus descendientes, y en un sentido más amplio, entre las especies vivas y las formas de vida eucarióticas más antiguas presentes en la Tierra.

### Fases del ciclo celular

En una población de células en división, ya sea dentro del cuerpo o en una placa de cultivo, cada célula pasa por una serie de etapas definidas, que constituyen el **ciclo celular** (**FIGURA 14-1**). Este se puede dividir en dos fases principales, basadas en actividades celulares fácilmente visibles con un microscopio óptico: fase M e

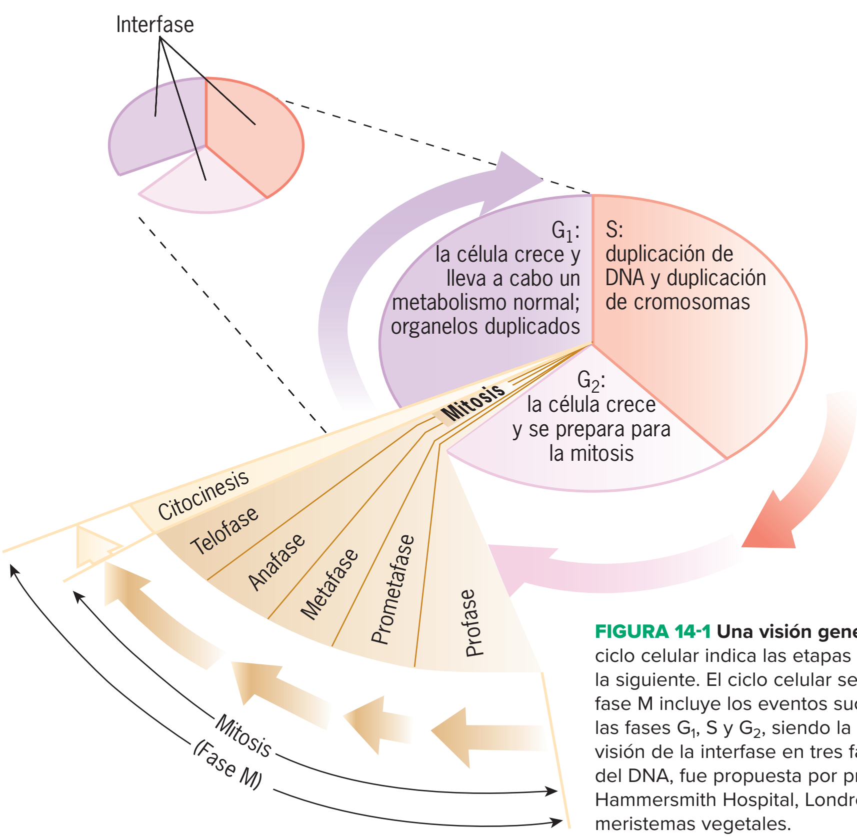



**FIGURA 14-1 Una visión general del ciclo de células eucarióticas.** Este diagrama del ciclo celular indica las etapas a través de las cuales una célula pasa de una división a la siguiente. El ciclo celular se divide en dos fases principales: fase M e interfase. La fase M incluye los eventos sucesivos de mitosis y citocinesis. La interfase se divide en las fases $G_1$, S y $G_2$, siendo la fase S equivalente al periodo de síntesis de DNA. La división de la interfase en tres fases separadas, basadas en el momento de la síntesis del DNA, fue propuesta por primera vez en 1953 por Alma Howard y Stephen Pelc del Hammersmith Hospital, Londres, sobre la base de sus experimentos con células de meristemas vegetales.

interfase. La **fase M** incluye 1) el proceso de **mitosis**, durante el cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos (cariocinesis) y 2) la **citocinesis**, durante la cual la célula completa se divide en dos células hijas. La **interfase**, el periodo entre las divisiones celulares, es un momento en que la célula crece y se involucra en diversas actividades metabólicas. Mientras que la fase M por lo general dura alrededor de una hora, en los mamíferos la interfase puede extenderse durante días, semanas o más, en dependencia del tipo de célula y las condiciones.

Aunque la fase M es el periodo en el que el contenido de una célula se divide realmente, se producen numerosas preparaciones para una próxima mitosis durante la interfase, incluida la replicación del DNA de la célula. Uno podría suponer que una célula se involucra en la replicación durante la interfase. Sin embargo, los estudios a principios de la década de 1950 sobre los cultivos asincrónicos (es decir, los cultivos cuyas células se distribuyen al azar a lo largo del ciclo celular) mostraron que ese no es el caso. Como se describe en el capítulo 13, la replicación del DNA se puede controlar mediante la incorporación de [$^3$H]timidina en el DNA recién sintetizado. Si se administra [$^3$H]timidina a un cultivo de células durante un periodo corto (p. ej., 30 minutos) y se fija una muestra de la población celular, se seca en un portaobjetos y se examina mediante autorradiografía, se encuentra que solo una fracción de las células tiene núcleos radiactivos. Entre las células que se dedicaron a la mitosis en el momento de la fijación (como lo demuestran sus cromosomas compactados), no se encontró que alguna tuviera un núcleo marcado radiactivamente. Estas células mitóticas tienen cromosomas no marcados porque no participaron en la replicación del DNA durante el periodo de marcado.

Si se permite que el marcaje continúe durante una o dos horas antes de que se muestreen las células, todavía no hay células con cromosomas mitóticos marcados (**FIGURA 14-2**). Podemos concluir a partir de estos resultados que existe un tiempo definido entre el final de la síntesis del DNA y el comienzo de la fase M. Este periodo se denomina $G_2$ (por segundo gap). La duración del $G_2$ se revela cuando uno continúa tomando muestras de células del cultivo hasta que se observan cromosomas mitóticos marcados. Las primeras células cuyos cromosomas mitóticos están marcados deben haber estado en las últimas etapas de la síntesis de DNA al comienzo de la incubación con [$^3$H]timidina. El tiempo transcurrido entre el inicio del periodo de marcado y la aparición de células con figuras mitóticas rotuladas corresponde a la duración del $G_2$.

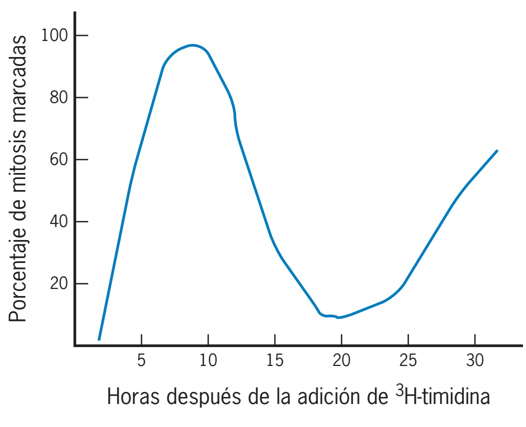



**FIGURA 14-2 Resultados experimentales que demuestran que la replicación ocurre durante un periodo definido del ciclo celular.** Células HeLa se cultivaron durante 30 minutos en un medio que contenía [$^3$H]timidina y luego se incubaron (rastrearon) varias veces en un medio sin marcar antes de fijarse y prepararse para la autorradiografía. Cada placa de cultivo se analizó en busca de células que estaban en mitosis en el momento en que se fijaron, y el porcentaje de aquellas células mitóticas cuyos cromosomas se marcaron se graficó como se muestra.

FUENTE: Tomada de un estudio de R. Baserga y F. Wiebel.

La replicación del DNA ocurre durante el periodo del ciclo celular denominado **fase S**. La fase S es también el periodo en que la célula sintetiza las histonas adicionales, que se necesitarán a medida que la célula duplica el número de nucleosomas en sus cromosomas (véase figura 13-23). La longitud de la fase S puede determinarse directamente. En un cultivo asincrónico, el porcentaje de células involucradas en una actividad particular es una medida aproximada del porcentaje de tiempo que esta actividad ocupa en las vidas de las células. Por tanto, si conocemos la duración de todo el ciclo celular, la longitud de la fase S se puede calcular directamente a partir del porcentaje de las células cuyos núcleos se marcan radiactivamente durante un pulso breve con [$^3$H]timidina. De forma similar, la longitud de la fase M se puede calcular a partir del porcentaje de células en la población que se considera participan en la mitosis o la citocinesis. Cuando se suman los periodos de $G_2$ + S + M, es evidente que hay un lapso adicional en el ciclo de la célula aún por contabilizar. Esta otra fase, denominada $G_1$ (por primer gap), es el periodo posterior a la mitosis que precede la síntesis del DNA.

## Ciclos celulares *in vivo*

Una de las propiedades que distingue varios tipos de células dentro de una planta o animal multicelular es su capacidad de crecer y dividirse. Podemos reconocer tres amplias categorías de células:

1. ***Células como las neuronas, las células musculares o los glóbulos rojos, que son altamente especializadas y carecen de la capacidad de dividirse.*** Una vez que estas células se han diferenciado, permanecen en ese estado hasta que mueren.
2. ***Células que normalmente no se dividen, pero que pueden inducirse a comenzar la síntesis del DNA y dividirse cuando se les administra un estímulo apropiado.*** En este grupo se incluyen las células hepáticas, que pueden ser inducidas a la proliferación mediante la extirpación quirúrgica de parte del hígado; y los linfocitos, mediante interacción con un antígeno apropiado.
3. ***Células que normalmente poseen un nivel relativamente alto de actividad mitótica.*** En esta categoría se incluyen las células madre de diversos tejidos adultos, como las células madre hematopoyéticas que producen glóbulos rojos y blancos (figura 17-6), y las células madre en la base de numerosos epitelios que recubren las cavidades corporales y la superficie del cuerpo (figura 7-1). Las células relativamente no especializadas de los meristemas apicales, localizados cerca de las puntas de las raíces y los tallos de las plantas, también exhiben una división celular rápida y continua. Las células madre tienen una propiedad importante que no comparten la mayoría de las células; son capaces de dividirse asimétricamente. Una **división celular asimétrica** es aquella en la que las dos células hijas tienen diferentes tamaños, componentes o destinos. La división asimétrica de una célula madre produce una célula hija que sigue siendo una célula madre no comprometida como su progenitora, y otra célula hija que se ha convertido en una célula diferenciada de ese tejido. En otras palabras, las divisiones asimétricas permiten que las células madre participen tanto en la autorrenovación como en la formación de células diferenciadas de tejidos. Algunos tipos de células que no son madres también pueden participar en divisiones celulares asimétricas por la formación de ovocitos y cuerpos polares, como se ilustra en la figura 14-41*b*).

Los ciclos celulares pueden variar desde intervalos tan cortos de 30 minutos en un embrión de rana en división, cuyos ciclos celulares carecen tanto de fases $G_1$ y $G_2$, hasta varios meses en tejidos de crecimiento lento como el hígado de los mamíferos. Se dice que muchas células en el cuerpo están *inactivas*, lo que significa que están en un estado que no las llevará a una próxima división celular, aunque conservan la capacidad de dividirse si las

condiciones cambian. Con algunas excepciones notables, las células que han dejado de dividirse se detienen en una etapa anterior al inicio de la síntesis del DNA. Las células inactivas a menudo se describen como que se encuentran en el estado $G_0$, para diferenciarlas de las típicas células de fase $G_1$ que pueden entrar pronto en la fase S. Una célula debe recibir una señal promotora del crecimiento para pasar de $G_0$ a la fase $G_1$, y así reingresar al ciclo celular.

**REPASO**

1. ¿Qué es el ciclo celular? ¿Cuáles son sus etapas? ¿Cómo varía el ciclo celular entre diferentes tipos de células?
2. Describa cómo la [$^3$H]timidina y la autorradiografía se pueden usar para determinar la duración de los diversos periodos del ciclo celular.

## 14.2 Regulación del ciclo celular

El estudio del ciclo celular no solo es importante en la biología celular básica, sino que también tiene enormes implicaciones prácticas en la lucha contra el cáncer, una enfermedad que resulta de una falla en la capacidad de una célula para regular su propia división. En 1970 una serie de experimentos de fusión celular llevados a cabo por Potu Rao y Robert Johnson, de la Universidad de Colorado, ayudaron a abrir la puerta a la comprensión de cómo se regula el ciclo celular.

Rao y Johnson querían saber si el citoplasma de las células contiene factores reguladores que afectan las actividades del ciclo celular. Ellos abordaron la cuestión fusionando células de mamíferos que se encontraban en diferentes etapas del ciclo celular. En un experimento fusionaron células mitóticas con células en otras etapas del ciclo. La célula mitótica siempre indujo la compactación de la cromatina en el núcleo de la célula no mitótica (**FIGURA 14-3**). Si se fusionaban una fase $G_1$ y una fase M, la cromatina del núcleo de la fase $G_1$ se sometía a una *compactación cromosómica prematura* para formar un conjunto de cromosomas alargados (figura 14-3*a*). Si se fusionaban una fase $G_2$ y una fase M, los cromosomas $G_2$ también se sometían a compactación cromosómica prematura, pero a diferencia de los núcleos $G_1$, los cromosomas $G_2$ compactados se duplicaron visiblemente, lo que refleja el hecho de que la replicación ya se había producido (figura 14-3*c*). Si una célula mitótica se fusionaba con una célula de fase S, la cromatina en fase S también se compactaba (figura 14-3*b*). Sin embargo, la replicación del DNA es bastante sensible al daño, por lo que la compactación en el núcleo de la fase S condujo a la formación de fragmentos cromosómicos "pulverizados" más que a los cromosomas compactos intactos. Los resultados de estos experimentos sugirieron que el citoplasma de una célula mitótica contenía factores difusibles que podrían inducir mitosis en una célula no mitótica (es decir, en interfase). Este hallazgo sugirió que la transición de $G_2$ a M estaba bajo control positivo; es decir, la transición fue inducida por la presencia de algún agente estimulador.

Si bien los experimentos de fusión celular revelaron la existencia de factores que regulaban el ciclo celular, no proporcionaron información sobre las propiedades bioquímicas de estos factores. Los conocimientos sobre la naturaleza de los agentes que promueven la entrada de una célula en la mitosis (o meiosis) se obtuvieron por primera vez en una serie de experimentos con ovocitos y embriones tempranos de ranas e invertebrados. Estos experimentos se describen en "Vías experimentales" en la sección 14.3. Para resumir, se demostró que la entrada de una célula en la fase M es iniciada por una proteína llamada *factor promotor de la maduración* (MPF, *maturation-promoting factor*). El MPF consta de dos subunidades: 1) una subunidad con actividad de cinasa que transfiere grupos de fosfato del ATP a residuos específicos de serina y treonina de sustratos proteicos específicos y 2) una subunidad reguladora llamada *ciclina*. El término *ciclina* se acuñó porque la concentración de esta proteína reguladora aumenta y disminuye en un patrón predecible con cada ciclo celular (**FIGURA 14-4**). Cuando la concentración de ciclina es baja, la cinasa carece de la subunidad ciclina, y como resultado está inactiva. Cuando la concentración de ciclina aumenta, la cinasa se activa, lo que hace que la célula entre en la fase M. Estos resultados sugieren que 1) la progresión de las células hacia la mitosis depende de una enzima cuya única

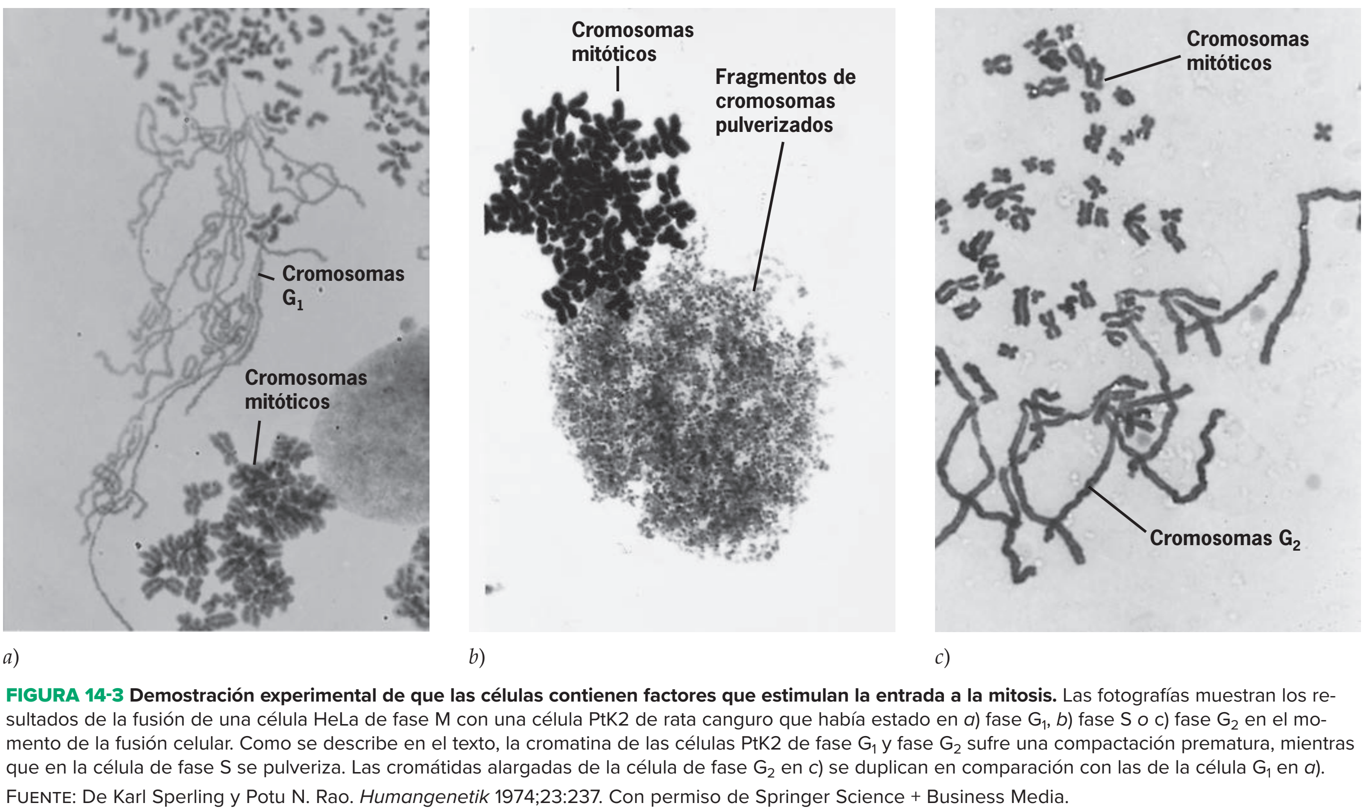



**FIGURA 14-3 Demostración experimental de que las células contienen factores que estimulan la entrada a la mitosis.** Las fotografías muestran los resultados de la fusión de una célula HeLa de fase M con una célula PtK2 de rata canguro que había estado en *a*) fase $G_1$, *b*) fase S o c) fase $G_2$ en el momento de la fusión celular. Como se describe en el texto, la cromatina de las células PtK2 de fase $G_1$ y fase $G_2$ sufre una compactación prematura, mientras que en la célula de fase S se pulveriza. Las cromátidas alargadas de la célula de fase $G_2$ en c) se duplican en comparación con las de la célula $G_1$ en *a*).
FUENTE: De Karl Sperling y Potu N. Rao. *Humangenetik* 1974;23:237. Con permiso de Springer Science + Business Media.

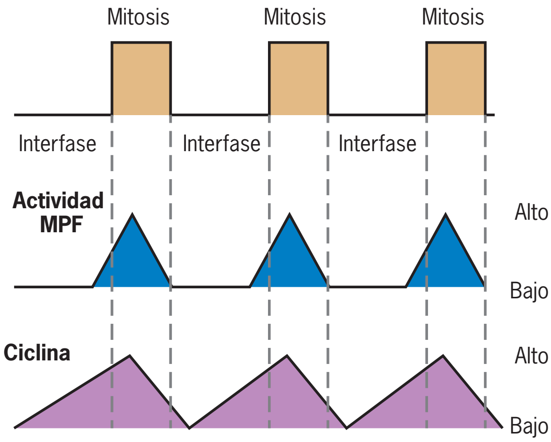



**FIGURA 14-4** Fluctuación de los niveles de ciclina y MPF durante el ciclo celular. Este dibujo muestra los cambios cíclicos que ocurren durante el desarrollo temprano de la rana, cuando las divisiones mitóticas ocurren rápida y sincrónicamente en todas las células del embrión. El trazado superior muestra la alternancia entre periodos de mitosis e interfase, el trazado medio muestra los cambios cíclicos en la actividad del MPF cinasa, y el trazado inferior muestra los cambios cíclicos en las concentraciones de ciclinas que controlan la actividad relativa del MPF cinasa.

FUENTE: De AW Murray y MW Kirschner. *Science* 1989;246:616; copyright 1989, AAAS. Science by Moses King, reproducida con permiso de la American Association for the Advancement of Science en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Centro de Autorización de Derechos de Autor.

actividad es fosforilar otras proteínas, y 2) la actividad de esta enzima está controlada por una subunidad cuya concentración varía desde una etapa del ciclo celular a otro.

**REPASO**

1. ¿Cuál es el efecto de fusionar una célula de fase $G_1$ con una en M, y de fusionar una célula de fase $G_2$ o S con una en M?
2. ¿Cómo varía la actividad del MPF durante todo el ciclo celular? ¿Cómo se correlaciona esto con la concentración de ciclinas? ¿Cómo afecta la concentración de ciclina la actividad del MPF?

# 14.3 VÍAS EXPERIMENTALES

## El descubrimiento y la caracterización del MPF

Cuando un ovocito anfibio se acerca al final de la ovogénesis, el núcleo grande (llamado vesícula germinal) se mueve hacia la periferia de la célula. En pasos posteriores la envoltura nuclear se desensambla, los cromosomas compactados se alinean a lo largo de una placa de metafase cerca de un extremo (el polo animal) del ovocito, y la célula experimenta la primera división meiótica para producir un gran ovocito secundario y un pequeño cuerpo polar. Los procesos de descomposición de las vesículas germinales y la primera división meiótica se conocen como *maduración*, y se pueden inducir en ovocitos totalmente desarrollados mediante el tratamiento con la hormona esteroidea progesterona. El primer signo de maduración en el ovocito anfibio tratado con hormona se observa de 13 a 18 horas tras el tratamiento con progesterona, a medida que la vesícula germinal se mueve cerca de la superficie del ovocito. Pronto le sigue la rotura de la vesícula germinal, y el ovocito alcanza la metafase de la segunda división meiótica alrededor de 36 horas después del tratamiento con hormonas. La progesterona induce la maduración solo si se aplica al medio externo que rodea al ovocito; si la hormona se inyecta en el ovocito, este no muestra respuesta.[1] Al parecer la hormona actúa en la superficie celular para desencadenar cambios secundarios en el citoplasma del ovocito, que conducen a la descomposición de las vesículas germinales y a los otros cambios asociados con la maduración.

Para obtener más información sobre la naturaleza del cambio citoplasmático responsable de desencadenar la maduración, Yoshio Masui de la Universidad de Toronto, y Clement Markert de la Universidad de Yale, comenzaron una serie de experimentos en los que eliminaron el citoplasma de ovocitos de rana aislados en diversas etapas después del tratamiento con progesterona, e inyectaron 40-60 nanolitros (nL) del citoplasma del donante en ovocitos inmaduros, completamente desarrollados, que no habían sido tratados con la hormona.[2] Descubrieron que el citoplasma tomado de los ovocitos durante las primeras 12 horas después del tratamiento con progesterona tuvo poco o ningún efecto en los ovocitos receptores. Después de este periodo, sin embargo, el citoplasma ganó la capacidad de inducir la maduración en el ovocito receptor. El citoplasma del ovocito donante tuvo efectividad máxima casi 20 horas después del tratamiento con progesterona, y su efectividad disminuyó a las 40 horas (**FIGURA 1**). Sin embargo, el citoplasma tomado de los embriones tempranos continuó mostrando cierta capacidad para inducir la

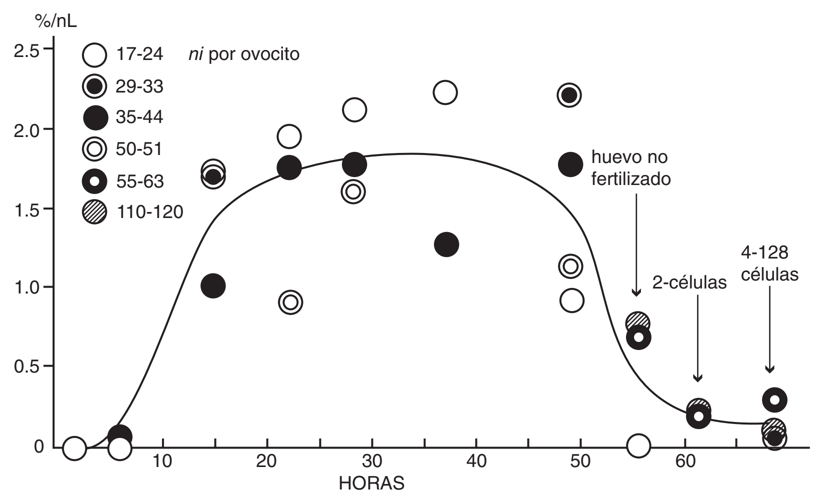



**FIGURA 1** Cambio de la actividad del factor promotor de la maduración en el citoplasma de los ovocitos de *Rana pipiens* durante el curso de la maduración y el desarrollo temprano. Ordenada: el cociente de la frecuencia de maduración inducida y el volumen de citoplasma inyectado. Cuanto mayor es el cociente, más eficaz es el citoplasma. nL, nanolitros de citoplasma inyectado. Abscisa: edad de los donantes (horas después de la administración de progesterona).

FUENTE: Por Masui y CL Markert. *Journal Exp Zoology* 1971;177:142. Reimpresa con permiso de John Wiley & Sons Publishers, Inc.

(*continúa*)

maduración de los ovocitos. Masui y Markert se refirieron a la(s) sustancia(s) citoplásmica(s) que inducen la maduración en los ovocitos receptores como "factor promotor de la maduración", que devino en MPF.

Como se asumió que el MPF estaba involucrado específicamente en activar la maduración de ovocitos, al principio se prestó relativamente poco interés a la sustancia o a su posible mecanismo de acción. Más tarde, en 1978, William Wasserman y Dennis Smith de la Universidad de Purdue publicaron un informe sobre el comportamiento del MPF durante el desarrollo temprano de anfibios.[3] Se había asumido que la actividad del MPF presente en los embriones tempranos era simplemente un residuo de actividad que había estado presente en el ovocito. Pero Wasserman y Smith descubrieron que la actividad del MPF experimenta fluctuaciones relevantes en la división de los huevos, que se correlacionan con los cambios en el ciclo celular. Se encontró, por ejemplo, que el citoplasma tomado de la división de huevos de rana dentro de 30-60 minutos después de la fertilización contiene poca o ninguna actividad detectable del MPF, como se demostró mediante la inyección en ovocitos inmaduros (**FIGURA 2**). Sin embargo, si el citoplasma se toma de un óvulo 90 minutos después de la fertilización, se puede mostrar otra vez la actividad del MPF. Esta alcanza un pico 120 minutos después de la fertilización, y comienza a disminuir de nuevo a los 150 minutos (figura 2). En el momento en que los huevos experimentan su primera citocinesis, a los 180 minutos, no se detecta actividad en ellos. Luego, a medida que se inicia el segundo ciclo de división, de nuevo reaparece la actividad del MPF, alcanzando un pico 225 minutos después de la fertilización, hasta disminuir a un nivel muy bajo. Se encontraron resultados similares en los huevos de *Xenopus*, excepto que las fluctuaciones en la actividad del MPF ocurren más rápidamente que en el de *Rana,* y se correlacionan con una mayor velocidad de división en el embrión temprano del *Xenopus*. Por tanto, la actividad del MPF desaparece y reaparece, en ambas especies de anfibios, en una escala de tiempo que se correlaciona con la duración del ciclo celular. En ambas especies el pico de actividad del MPF corresponde al instante de la ruptura de la membrana nuclear y la entrada de las células en la mitosis. Estos hallazgos sugieren que el MPF hace más que controlar el tiempo de maduración de los ovocitos, y de hecho puede desempeñar un papel clave en la regulación del ciclo celular de las células en división.

En apariencia, alrededor de este mismo periodo, la actividad del MPF no se limita a los huevos de anfibios y ovocitos, sino que está presente en una amplia variedad de organismos. Se encontró, por ejemplo, que las células de mamíferos que crecen en cultivo también poseen actividad de MPF, como se demostró mediante la capacidad de los extractos de células de mamífero para inducir la descomposición de vesículas germinales cuando se inyectan en ovocitos anfibios.[4] La actividad del MPF de las células de mamífero fluctúa con el ciclo celular, como lo hace al dividir los huevos de anfibios. Los extractos de células HeLa cultivadas, preparadas a partir de células $G_1$ tempranas, $G_1$ tardías, o de fase S, carecen de actividad MPF (**FIGURA 3**). El MPF aparece en el $G_2$ temprano, tiene un aumento enérgico en el $G_2$ tardío y alcanza el pico en la mitosis.

Otro elemento de la maquinaria que regula el ciclo celular se descubrió en estudios sobre embriones de erizo de mar. Los huevos de ese animal han sido un tema recurrente en los estudios de división celular, debido a que las divisiones mitóticas que siguen a la fertilización ocurren con rapidez y están separadas por intervalos altamente predecibles. Si los huevos de esa especie se fecundan en agua de mar que contiene un inhibidor de la síntesis de proteínas, los huevos no se someten a la primera división mitótica, deteniéndose en una etapa anterior a la compactación cromosómica y a la ruptura de la envoltura nuclear. De manera similar, cada una de las divisiones mitóticas subsiguientes también se pueden bloquear si se agrega un inhibidor de la síntesis de proteínas al medio, en un instante muy anterior a que ocurra la división normalmente. Este hallazgo ha sugerido que una o más proteínas se deben sintetizar durante cada uno de los primeros ciclos celulares si se produce la división mitótica subsiguiente. Pero los primeros estudios sobre la división de huevos de erizo de mar no revelaron la aparición de nuevas especies de proteínas durante este periodo.

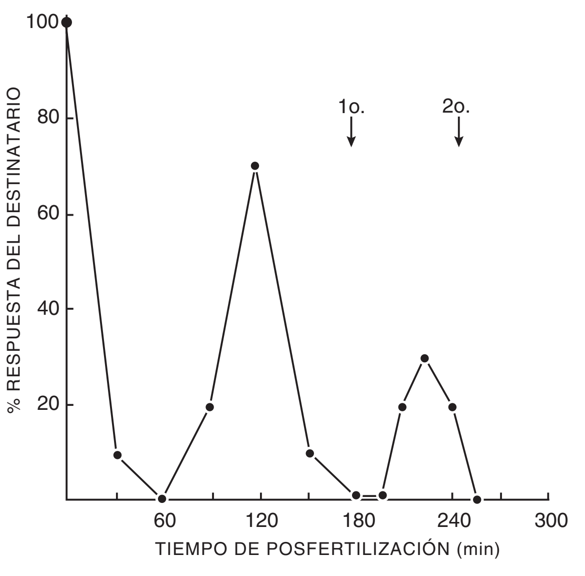



**FIGURA 2** Reciclaje de la actividad MPF en huevos fertilizados de *R. pipiens*. Ordenada: porcentaje de receptores de ovocitos sometidos a descomposición de vesículas germinales en respuesta a 80 nanolitros de citoplasma de huevos fertilizados. Abscisa: tiempo después de la fertilización cuando se analizó el citoplasma del huevo *Rana* para determinar la actividad del MPF. Las flechas indican el tiempo de las divisiones.

FUENTE: WJ Wasserman y LD Smith. *Journal Cell Biology* 1978;78:R 15. The Journal of Cell Biology por el Rockefeller Institute; American Society for Cell Biology Copyright 1978. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press en el formato de republicación de un libro de texto vía Copyright Clearance Center.

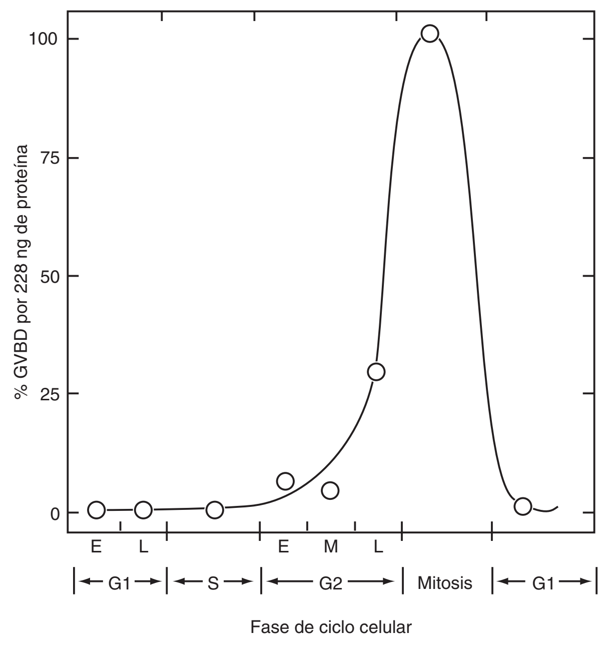



**FIGURA 3** *Actividad promotora de la maduración de extractos de células HeLa durante diferentes etapas del ciclo celular.* Debido a que 228 ng de proteína mitótica indujeron la descomposición de vesículas germinales (GVBD, *germinal vesicle breakdown*) en 100% de los casos, el porcentaje de actividad para otras fases del ciclo celular se normalizó a esa cantidad de proteína. E (*early*): temprano; M (*mid*): medio y L (*late*): tardío.

FUENTE: PS Sunkara, DA Wright y PN Rao. *Proc Natl Acad Science USA* 1979;76:2801.

En 1983 Tim Hunt y sus colegas del Laboratorio de Biología Marina en Woods Hole informaron sobre varias proteínas que se sintetizan en huevos de erizo de mar fertilizados, pero no en huevos no fertilizados.[5] Para estudiar estas proteínas aún más, incubaron huevos fertilizados en agua de mar que contenía [$^{35}$S] metionina y retiraron muestras a intervalos de 10 minutos, comenzando a los 16 minutos después de la fertilización. Se prepararon extractos de proteína no procesada a partir de las muestras, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, y las proteínas marcadas se localizaron mediante autorradiografía. Varias bandas prominentes fueron marcadas en geles a partir de extractos de huevos fertilizados, que no eran evidentes en extractos comparables hechos de huevos no fertilizados. Una de las bandas que apareció fuertemente marcada en etapas tempranas después de la fertilización desapareció prácticamente del gel 85 minutos después de la fertilización, lo que sugiere que la proteína se había degradado de manera selectiva. Esta misma banda luego reapareció en geles de huevos muestreados en tiempos posteriores, y desapareció una vez más en una muestra tomada 127 minutos después de la fertilización. Las fluctuaciones en la cantidad de esta proteína se representan gráficamente en la **FIGURA 4** (banda de proteína A) junto con el índice de división, que indica el transcurso del tiempo de las dos primeras divisiones celulares. La degradación de la proteína ocurre casi al mismo tiempo que las células transitan por la primera y segunda divisiones. Se encontró una proteína similar en los huevos de la almeja, otro invertebrado cuyos huevos han sido ampliamente estudiados. Hunt y colegas nombraron a la proteína “ciclina”, y notaron el paralelo sorprendente en el comportamiento de las fluctuaciones en los niveles de ciclina en su investigación con la actividad del MPF en los estudios anteriores. Estudios posteriores mostraron que había dos ciclinas diferentes –A y B– que se degradan en diferentes momentos durante el ciclo celular. La ciclina A se degrada durante un periodo de 5-6 minutos, que comienza justo antes de la transición de metafase-anafase, y la ciclina B se degrada unos minutos después de esta transición. Estas investigaciones proporcionaron la primera indicación de la importancia de la proteólisis controlada (p. 578) en la regulación de una actividad celular importante.

El primer vínculo claro entre la ciclina y el MPF fue demostrado por Joan Ruderman y sus colegas en el Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole.[6] En estos estudios un mRNA que codifica la ciclina A se transcribió *in vitro*, a partir de un fragmento de DNA clonado que contenía la secuencia de codificación de la ciclina A completa. La identidad de este mRNA se verificó traduciéndolo *in vitro* y descubriendo que codificaba auténtica ciclina A de almeja. Cuando se inyectó el mRNA de ciclina sintética en ovocitos de *Xenopus*, las células sufrieron la descomposición de las vesículas germinales y la compactación cromosómica, en un lapso no muy diferente al inducido por el tratamiento con progesterona (**FIGURA 5**). Estos resultados sugieren que el aumento de la ciclina A, que se produce durante la meiosis y la mitosis, tiene un papel directo en la promoción de la entrada en la fase M. La cantidad de ciclina A cae rápidamente y se debe resintetizar antes de la próxima división o las células no pueden volver a entrar en la fase M.

Pero, ¿cuál es la relación entre las ciclinas y el MPF? Una de las dificultades para responder esta pregunta ha sido que se han tomado como objeto de estudio organismos diversos. El MPF se había investigado principalmente en anfibios, y las ciclinas en erizos de mar y almejas. La evidencia indica que los ovocitos de rana contienen un grupo de moléculas preMPF inactivas, que se convierten en MPF activas durante la meiosis I. La ciclina, por otro lado, está ausente de los ovocitos de almeja, pero aparece poco después de la fertilización. Ruderman consideró la posibilidad de que la ciclina A sea un activador del MPF. Sobre este tema volveremos más adelante.

Mientras tanto, otra línea de investigación se inició para purificar y caracterizar la sustancia responsable de la actividad MPF. En 1980 Michael Wu y John Gerhart de la Universidad de

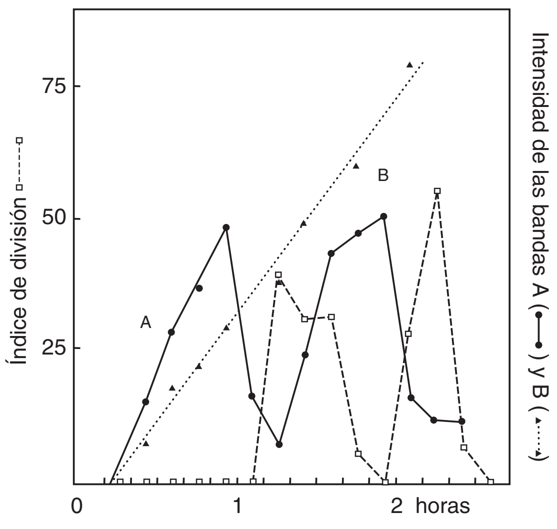



**FIGURA 4** Correlación del nivel de ciclina con el ciclo de división celular. Se fertilizó una suspensión de huevos y, después de 6 minutos, se añadió [$^{35}$S]metionina. Se tomaron muestras para el análisis mediante electroforesis en gel a intervalos de 10 minutos, comenzando 16 minutos después de la fertilización. La autorradiografía del gel electroforético se escaneó para determinar la densidad de la marca, y los datos se representaron gráficamente como se muestra. La proteína A, que varía de acuerdo con el ciclo celular y se llama ciclina, se muestra como círculos sólidos. La proteína B (que no debe confundirse con ciclina B), que no muestra fluctuación del ciclo celular, se traza como triángulos sólidos. El porcentaje de células que experimentan división en un periodo dado se da como el índice de división (cuadrados abiertos).

FUENTE: T Evans, *et al*. *Cell* 1983;33:391. Cell by Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Copyright Clearance Center.

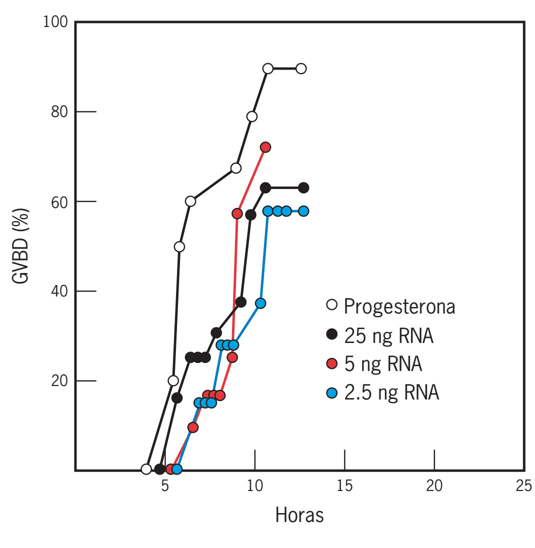



**FIGURA 5** Cinética de la activación de ovocitos de *Xenopus* por progesterona y mRNA de ciclina A. Los ovocitos grandes inmaduros se aislaron a partir de fragmentos de ovarios y se incubaron con progesterona o se microinyectaron con cantidades variables de mRNA de ciclina A. A las 3-4 horas después de la inyección los ovocitos obviamente dañados se eliminaron (de 2-4 por grupo de partida de 20) y a los restantes (que representan el valor de 100%) se les permitió desarrollarse. La rotura de la vesícula germinal (GVBD) y la activación de los ovocitos se mostraron por la formación de una mancha blanca en la región del polo animal y se confirmaron por disección de los ovocitos.

FUENTE: De KI Swenson, KM Farrell y JV Ruderman. *Cell* 1986;47:865. Cell por Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

(*continúa*)

California, Berkeley, lograron la purificación del MPF unas 20-30 veces precipitando la proteína en sulfato de amonio, y sometiendo el material redisuelto a cromatografía en columna. Además de estimular la maduración de los ovocitos, las inyecciones del MPF parcialmente purificadas estimularon la incorporación de $^{32}$P en las proteínas del ovocito anfibio.[7] Cuando las preparaciones del MPF parcialmente purificadas se incubaron con [$^{32}$P]ATP *in vitro,* las proteínas presentes en la muestra se fosforilaron, lo que sugiere que el MPF indujo la maduración al actuar como una proteína cinasa.

El MPF se purificó en 1988 mediante una serie de seis pasos cromatográficos sucesivos.[8] La actividad del MPF en estas preparaciones purificadas se asociaba en forma consistente con dos polipéptidos, uno que tenía una masa molecular de 32 kDa y el otro de 45 kDa. La preparación purificada del MPF poseía un alto nivel de actividad de proteína cinasa, como se determinó por la incorporación de la radiactividad del [$^{32}$P] ATP en las proteínas. Cuando la preparación purificada fue incubada en presencia de [$^{32}$P]ATP, el polipéptido de 45 kDa quedó marcado.

Hacia finales de la década de 1980 los esfuerzos para descubrir el papel de las ciclinas y el MPF se habían comenzado a fusionar con otra línea de investigación, que Paul Nurse y sus colegas de la Universidad de Oxford estaban llevando a cabo sobre la fisión de levadura.[9] Se había demostrado que la levadura producía una proteína cinasa con un peso molecular de 34 kDa, cuya actividad se requería para que estas células ingresaran a la fase M (discutida en la sección 14.4). La proteína de levadura se llamó p34$^{cdc2}$ o simplemente cdc2. La primera evidencia de un vínculo entre la cdc2 y el MPF se produjo como resultado de una colaboración entre los grupos de investigación de levadura y anfibios.[10, 11] Recordemos del estudio anterior que se descubrió que el MPF contiene proteínas de 32 y 45 kDa. Se demostró que los anticuerpos formados contra la cdc2 de la levadura de fermentación reaccionan específicamente con el componente de 32 kDa del MPF, aislado de huevos de *Xenopus*. Estos hallazgos indican que este componente del MPF es un homólogo de la levadura cinasa de 34 kDa, y por tanto que la maquinaria que controla el ciclo celular en levaduras y vertebrados contiene componentes conservados evolutivamente.

Un estudio similar que utilizó anticuerpos contra la cdc2 de levadura demostró que la proteína homóloga en vertebrados no fluctúa durante el ciclo celular.[12] Esto respalda la propuesta de que la proteína cinasa de 32 kDa en células de vertebrados depende de otra proteína. Se pronosticaba que el modulador sería la ciclina, que aumenta de concentración durante cada ciclo celular y luego se destruye a medida que las células entran en anafase. Esta propuesta fue verificada tras una serie de estudios en los que el MPF se purificó de anfibios, almejas y estrellas de mar y se analizó su composición polipeptídica.[13-15] En todos estos casos se demostró que el MPF activo presente en las células animales de fase M es un complejo que consta de dos tipos de subunidades: 1) una subunidad de 32 kDa que contiene el sitio activo de proteína cinasa y es homóloga a la proteína cinasa cdc2 de levadura, y 2) una subunidad mayor (45 kDa) identificada como una ciclina, cuya presencia se requiere para la actividad de la cinasa. Los estudios descritos en estas "Vías experimentales" proporcionaron una visión uniforme de la regulación del ciclo celular en todos los organismos eucarióticos. Además, establecen el escenario para el análisis de los numerosos factores que controlan la actividad del MPF (cdc2) en diversos puntos durante los ciclos de células de levadura y mamíferos, que se han convertido en el foco de atención en los últimos años. Muchos de los hallazgos más importantes de estos estudios recientes se discuten en la primera sección de este capítulo.

## Referencias


1. Smith LD y Ecker RE. The interaction of steroids with *R. pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* 1971;25:233-247.
2. Masui Y y Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177:129-146.
3. Wasserman WJ y Smith LD. The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol* 1978;78:R15-R22.
4. Sunkara PS, Wright DA y Rao PN. Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1979;76:2799-2802.
5. Evans T, *et al*. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983;33:389-396.
6. Swenson KI, Farrell KM y Ruderman JV. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1986;47:861-870.
7. Wu M & Gerhart JC. Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis. Dev Biol* 1980;79:465-477.
8. Lohka MJ, Hayes MK y Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1988;85:3009-3013.
9. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503-507.
10. Gautier J, *et al*. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2* 1. *Cell* 1988;54:433-439.
11. Dunphy WG, *et al*. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988;54:423-431.
12. Labbe JC, *et al*. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 1988;335:251-254.
13. Labbe JC, *et al*. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989;8:3053-3058.
14. Draetta G, *et al*. cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 1989;56:829-838.
15. Gautier J, *et al*. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 1990;60:487-494.


## 14.4 Control del ciclo celular: el papel de las proteínas cinasas

En las últimas dos décadas un gran número de laboratorios se han centrado en las enzimas tipo MPF, llamadas **cinasas dependientes de ciclinas** (**Cdk,** *cyclin-dependent kinases*). Se ha encontrado que las Cdk no solo están involucradas en la fase M, sino que son las agentes clave que orquestan las actividades a lo largo del ciclo celular. Las Cdk llevan a cabo esta función mediante la fosforilación de una gran variedad de proteínas. Cada evento de fosforilación ocurre en un punto apropiado durante el ciclo celular, estimulando o inhibiendo de ese modo un proceso celular particular involucrado en la división celular. Las células de levadura han sido particularmente útiles en estudios del ciclo celular, debido en parte a la disponibilidad de mutantes sensibles a la temperatura, cuyas proteínas anormales afectan a diversos procesos del ciclo celular. Como se discutió en la página 516, los mutantes sensibles a la temperatura se pueden cultivar de una manera relativamente normal a una temperatura inferior (permisiva), y luego cambiarse a una temperatura más alta (restrictiva) para estudiar el efecto del producto del gen mutante.

Los investigadores que estudian el control genético del ciclo celular se han centrado en dos especies alejadas de levadura, la

levadura en gemación *Saccharomyces cerevisiae,* que se reproduce mediante la formación de yemas en un extremo de la célula (véase figura 1-18*b*), y la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe*, que se reproduce alargándose y luego dividiéndose en dos células de igual tamaño (véase figura 14-6). La base molecular de la regulación del ciclo celular se ha conservado notablemente a lo largo de la evolución de los eucariotas. Una vez que se ha identificado un gen implicado en el control del ciclo celular en una de las dos especies de levadura se buscan homólogos, y por lo general se encuentran en los genomas de eucariotas superiores, incluidos los humanos. Mediante la combinación de análisis genéticos, bioquímicos y de células vivas, los investigadores han adquirido una comprensión integral de las principales actividades que permiten que una célula crezca y se reproduzca en un plato de cultivo de laboratorio. La investigación sobre el control genético del ciclo celular en la levadura comenzó en la década de 1970 en dos laboratorios, inicialmente el de Leland Hartwell en la Universidad de Washington, trabajando en brotes de levadura, y con posterioridad en el de Paul Nurse, en la Universidad de Oxford, trabajando en levadura con fisión. Ambos laboratorios identificaron un gen que, cuando muta, provoca que el crecimiento de las células a temperatura elevada se detenga en ciertos puntos del ciclo celular. El producto de este gen, que se denominó *cdc2* en la levadura con fisión (y *CDC28* en la levadura en gemación), al final se encontró que era homólogo a la subunidad catalítica del MPF; en otras palabras, era una cinasa dependiente de ciclina. La investigación posterior en levaduras, así como en muchas células de diferentes vertebrados, ha respaldado el concepto de que la progresión de una célula eucariota a lo largo de su ciclo celular está regulada en distintas etapas. Una de las etapas principales de regulación ocurre cerca del final de $G_1$, y otra cerca del final de $G_2$. Estas etapas representan puntos en el ciclo celular en el que una célula se compromete a comenzar un evento crucial, ya sea iniciando la replicación o ingresando a la mitosis.

Comenzaremos nuestra discusión con la levadura con fisión, que tiene el ciclo celular menos complejo. En esta especie la misma Cdk (cdc2) es responsable del paso a través de ambos puntos de compromiso, aunque en asociación con diferentes ciclinas. En la **FIGURA 14-5** se muestra una representación simplificada de la regulación del ciclo celular en la levadura con fisión. El primer punto de transición, que se llama COMIENZO, se produce a finales del $G_1$. Una vez que una célula ha pasado el COMIENZO, se compromete irrevocablemente a replicar su DNA, y en última instancia, a completar el ciclo celular.[1] El paso a través del COMIENZO requiere la activación de la cdc2 por una o más *ciclinas* $G_1/S$, cuyos niveles aumentan durante la última $G_1$ (figura 14-5).

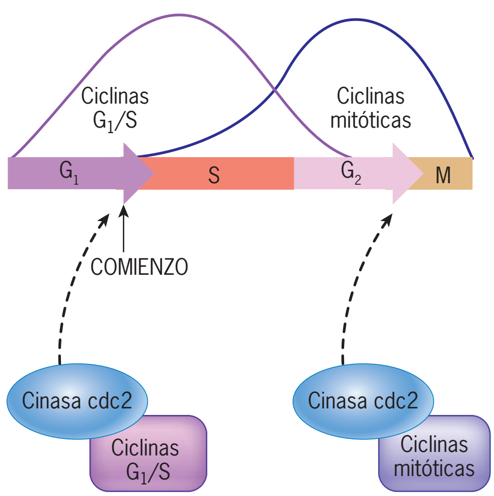



**FIGURA 14-5 Un modelo simplificado para la regulación del ciclo celular en la fisión de levadura.** El ciclo celular se controla principalmente en dos puntos, el COMIENZO y la transición $G_2$-M. El paso de una célula a través de estas dos coyunturas críticas (puntas de flecha violeta) requiere de la activación de la misma cdc2 cinasa por diferentes clases de ciclinas, ya sea la $G_1/S$ o ciclinas mitóticas. Una tercera transición importante ocurre al final de la mitosis, y se activa por una disminución rápida en la concentración de ciclinas mitóticas. (*Nota:* cdc2 también se conoce como Cdk1).

El paso del $G_2$ a la mitosis requiere la activación de la cdc2 por un grupo diferente de ciclinas —las *ciclinas mitóticas*—. Las Cdk que contienen una ciclina mitótica (p. ej., el MPF descrito en la sección 14.3) que fosforilan los sustratos requeridos para que la célula entre en la mitosis. Entre los sustratos se incluyen las proteínas necesarias para los cambios dinámicos en la organización de los cromosomas y el citoesqueleto, que caracterizan el cambio de la interfase a la mitosis. Las células hacen un tercer compromiso durante la mitad de la mitosis, que determina si completarán la división celular y volverán a ingresar al $G_1$ del siguiente ciclo. La salida de la mitosis y la entrada en el $G_1$ depende de una disminución rápida en la actividad de la Cdk, que resulta de una caída en la concentración de las ciclinas mitóticas (figura 14-5), un evento que se discutirá en la sección 14.10 junto con otras actividades mitóticas.

Las cinasas dependientes de ciclina a menudo se describen como el "conductor" que guía el ciclo celular a través de sus diversas etapas. Las actividades de estas enzimas están reguladas por una variedad de "frenos" y "aceleradores" que operan en combinación entre sí.

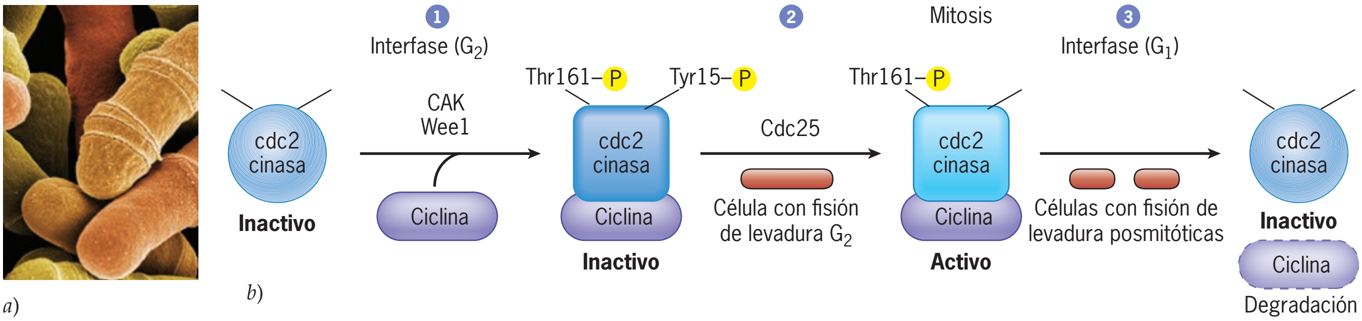
## Enlace de la ciclina

Como se indica en la figura 14-5, los niveles de ciclinas particulares aumentan con el tiempo. Cuando una ciclina alcanza una concentración suficiente en la célula, se une a la subunidad catalítica de una Cdk, causando un cambio importante en la conformación del sitio activo de la enzima. Las estructuras de cristalografía de rayos X de diversos complejos de ciclina-Cdk indican que la unión de ciclina provoca el movimiento de un bucle flexible de la cadena de polipéptidos Cdk lejos de la apertura del sitio activo, permitiendo que la Cdk fosforile sus sustratos proteicos.

## Fosforilación/desfosforilación de la Cdk

Ya hemos visto en otros capítulos que muchos eventos que tienen lugar en una célula están regulados por la adición y eliminación de grupos fosfato en las proteínas. Esto mismo es cierto para los eventos que conducen al inicio de la mitosis. Podemos ver en la figura 14-5 que el nivel de ciclinas mitóticas se eleva a través de S y $G_2$. Las ciclinas mitóticas presentes en una célula de levadura durante este periodo se unen a la Cdk para formar un complejo de ciclina-Cdk, pero el complejo muestra poca evidencia de actividad cinasa. Después, tarde en el $G_2$, la ciclina-Cdk se activa y se inicia la mitosis. Para comprender este cambio en la actividad de la Cdk, debemos analizar la actividad de otras tres enzimas reguladoras; dos cinasas y una fosfatasa. Veremos brevemente los eventos que ocurren en la levadura con fisión (**FIGURA 14-6*a***). El papel de estas enzimas en el ciclo de levadura con fisión, que se ilustra en la figura 14-6*b*), se reveló a través de una combinación de análisis genéticos y bioquímicos. En el paso 1, una de las cinasas llamada CAK (cinasa activadora de Cdk) fosforila un residuo crítico de treonina (Thr 161 de cdc2 en la figura 14.6*b*). La fosforilación de este residuo es necesaria, pero no suficiente para que la Cdk esté activa. Una segunda proteína cinasa mostrada en el paso 1, llamada Wee1, fosforila un residuo de tirosina clave en la bolsa de unión al ATP de la enzima (Tyr 15 de cdc2 en la figura 14-6*b*). Si

[1] Las células de mamífero pasan por un punto comparable durante el $G_1$, denominado punto de restricción, momento en el que se comprometen con la replicación del DNA y el completamiento de la mitosis finalmente. Antes del punto de restricción, si las células de mamífero van a progresar en el ciclo celular, requieren de la presencia de factores de crecimiento en su medio de cultivo. Después de pasar el punto de restricción, estas mismas células continuarán durante el resto del ciclo celular sin estimulación externa.



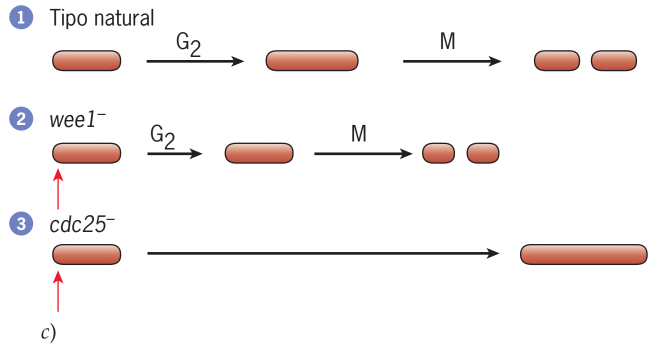




**FIGURA 14-6 La progresión a través del ciclo celular de la levadura con fisión requiere de la fosforilación y desfosforilación de los residuos críticos de cdc2.** *a*) Micrografía electrónica de barrido coloreada de células de levadura con fisión de tipo natural. *b*) Durante el $G_2$, la cdc2 cinasa interactúa con una ciclina mitótica, pero permanece inactiva como resultado de la fosforilación de un residuo clave de tirosina (Tyr 15 en la levadura con fisión) por la Wee1 (paso 1). Una cinasa separada, llamada CAK, transfiere un fosfato a otro residuo (Thr 161), que se requiere más adelante para la actividad cdc2 cinasa en el ciclo celular. Cuando la célula alcanza un tamaño crítico se activa una enzima llamada Cdc25 fosfatasa, que elimina el fosfato inhibidor en el residuo Tyr 15. La activación resultante de la cdc2 cinasa conduce a la célula a la mitosis (paso 2). Al final de la mitosis (paso 3), el grupo estimulante de fosfato se elimina de Thr 161 por otra fosfatasa. La ciclina libre se degrada luego, y la célula comienza otro ciclo. (La Cdk mitótica en células de mamífero está fosforilada y desfosforilada de manera similar). *c*) La identificación de la Wee1 cinasa y la Cdc25 fosfatasa se realizó mediante el estudio de mutantes que se comportaron como se muestra en esta figura. La línea 1 muestra las etapas $G_2$ y M de una célula de tipo natural. La línea 2 muestra el efecto de un gen mutante *wee1*; la célula se divide prematuramente, formando células pequeñas (wee). La línea 3 muestra el efecto de un gen *cdc25* mutante; la célula no se divide, sino que continúa creciendo. La flecha roja marca el momento en que la temperatura aumenta para inactivar la proteína mutante.

FUENTE: *a*) Steve Gschmeissner/Photo Researchers, Inc. *b*) Según TR Coleman y WG Dunphy. *Curr Opin Cell Biol* 1994;76:877. Current Opinion in Cell Biology de Elsevier Ltd. Reproducida con permiso de Elsevier Ltd en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Centro de autorización de derechos de autor.

este residuo se fosforila, la enzima estará inactiva, con independencia del estado de fosforilación de cualquier otro residuo. En otras palabras, el efecto de la Wee1 anula el efecto de la CAK, manteniendo la Cdk en un estado inactivo. La línea 2 de la figura 14-6*c*) muestra el fenotipo de las células con un gen mutante *weel*. Estos mutantes no pueden mantener la Cdk en un estado inactivo, y se dividen en una etapa temprana del ciclo celular produciendo células más pequeñas, de ahí el nombre “wee” (pequeñitas). En las células normales (tipo nativo), la Wee1 mantiene inactiva la Cdk hasta el final del $G_2$. Más tarde, al final del $G_2$, el fosfato inhibidor en Tyr 15 es eliminado por la tercera enzima, una fosfatasa llamada Cdc25 (paso 2, figura 14-6*b*). La eliminación de este fosfato cambia las moléculas de ciclina-Cdk almacenadas al estado activo, lo que le permite fosforilar los sustratos clave y conducir la célula de levadura a la mitosis. La línea 3 de la figura 14-6*c*) muestra el fenotipo de las células con un gen *cdc25* mutante. Estos mutantes no pueden eliminar el fosfato inhibidor de la Cdk, y no pueden ingresar a la mitosis. El equilibrio entre las actividades de la Wee1 cinasa y la *Cdc25* fosfatasa, que normalmente determina si la célula permanecerá en el $G_2$ o progresará hacia la mitosis, está regulado por otras cinasas y fosfatasas. Como veremos en breve, estas vías pueden impedir que la célula ingrese a la mitosis en condiciones que puedan conducir a una división celular anormal.

## Inhibidores de la Cdk

La actividad de la Cdk puede ser bloqueada por una variedad de inhibidores. En los brotes de levadura, por ejemplo, una proteína llamada Sic1 actúa como un inhibidor de la Cdk durante el $G_1$. La degradación de la Sic1 permite que la ciclina-Cdk presente en la célula inicie la replicación del DNA. El papel de los inhibidores de Cdk en las células de mamífero se discute en la página 552.

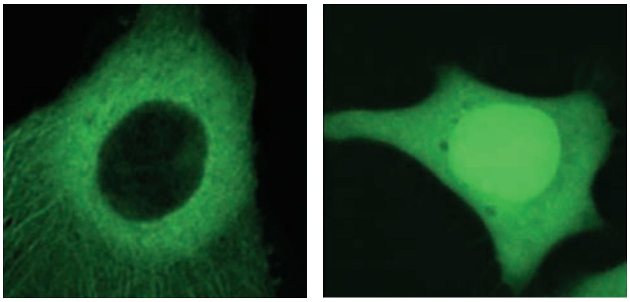
## Proteólisis controlada

En las figuras 14-4 y 14-5 se ve que las concentraciones de ciclina oscilan durante cada ciclo celular, lo que conduce a cambios en la actividad de las Cdk. Las células regulan la concentración de ciclinas y otras proteínas clave del ciclo celular, ajustando tanto la velocidad de síntesis como la velocidad de destrucción de la molécula en diferentes puntos del ciclo celular. La degradación se logra por medio de la ruta ubiquitina-proteosoma descrita en la sección 12.21. A diferencia de otros mecanismos que controlan la actividad Cdk, la degradación es un evento irreversible que ayuda a conducir el ciclo celular en una sola dirección. La regulación del ciclo celular requiere dos clases de complejos multisubunidad (complejos SCF y APC) que funcionan como *ligasas de ubiquitina*. Estos complejos reconocen las proteínas a ser degradadas y las unen a una cadena de poliubiquitina, que asegura su destrucción en un proteosoma. El complejo SCF está activo desde el final del $G_1$ hasta la mitosis temprana (véase figura 14-26*a*) y media la destrucción de las ciclinas $G_1$/S, los inhibidores de Cdk y otras proteínas del ciclo celular. Estas proteínas se convierten en objetivos para un SCF después de que son fosforiladas por las proteínas cinasas (es decir, Cdk) que regulan el ciclo celular. Las mutaciones que inhiben a los SCF de la proteólisis mediadora de proteínas clave, como las ciclinas $G_1$/S o el inhibidor de Cdk Sic1 antes mencionado, pueden evitar que las células entren en la fase S y repliquen su DNA. El complejo APC actúa en la mitosis y degrada una cantidad de proteínas mitóticas clave, incluidas las ciclinas mitóticas. La destrucción de las ciclinas mitóticas permite que una célula salga de la mitosis y entre en un nuevo ciclo celular (sección 14.10).

## Localización subcelular

Las células contienen varios compartimientos diferentes donde las moléculas reguladoras se pueden unir o separar de las proteínas con las que interactúan. La localización subcelular es un fenómeno dinámico, en el que los reguladores del ciclo celular se mueven a diferentes compartimientos en etapas diversas. Por ejemplo, una de las principales ciclinas mitóticas en células animales (ciclina B1) se desplaza entre el núcleo y el citoplasma hasta el $G_2$, cuando se acumula en el núcleo justo antes del inicio de la mitosis (**FIGURA 14-7**). Según una propuesta, la acumulación

nuclear de ciclina B1 se ve facilitada por la fosforilación de uno o más residuos de serina que residen en su señal de exportación nuclear (NES, *nuclear export signal*, p. 462). En este modelo la fosforilación bloquea la posterior exportación de la ciclina de vuelta al citoplasma. De acuerdo con una propuesta alternativa, la ciclina B1-Cdk1 estimula su propia translocación en el núcleo, mediante la fosforilación y activación de componentes de la maquinaria de importación nuclear. Con independencia del mecanismo, si la acumulación nuclear de la ciclina está bloqueada, las células no inician la división celular.



*a*) *b*)

**FIGURA 14-7 Demostración experimental de localización subcelular durante el ciclo celular.** Micrografías de una célula HeLa viva que se ha inyectado con ciclina B1 unida a la proteína fluorescente verde (p. 260). La célula que se muestra en *a*) está en la fase $G_2$ de su ciclo celular, y la ciclina B1 marcada con fluorescencia se localiza casi por completo en el citoplasma. La micrografía en *b*) muestra la célula en profase de la mitosis, y la ciclina B1 marcada se concentra en el núcleo de la célula. La base de este cambio en la localización se analiza en el texto.

FUENTE: Paul Clute y Jonathan Pines. *Nature Cell Biol* 1999;1:83. Reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Limited.

Como se vio antes, las proteínas y los procesos que controlan el ciclo celular están notablemente conservados entre los eucariotas. Como en la levadura, las sucesivas oleadas de síntesis y degradación de diferentes ciclinas desempeñan un papel clave en la conducción de células de mamífero de una etapa a la siguiente. A diferencia de las células de levadura, que tienen una sola Cdk, las células de mamíferos producen varias versiones de esta proteína cinasa. Diversos complejos de Cdk-ciclina se dirigen a diferentes grupos de sustratos, en distintos puntos dentro del ciclo celular. El emparejamiento entre ciclinas individuales y Cdk es específico, y solo se encuentran ciertas combinaciones (**FIGURA 14-8*a***). En las células de mamíferos, por ejemplo, la actividad de un complejo de ciclina E-Cdk2 conduce a la célula a la fase S, mientras que la actividad de un complejo de ciclina B1-Cdk1 (el MPF de mamífero) conduce a la célula a la mitosis. Las Cdk no siempre estimulan las actividades, sino que también pueden inhibir eventos inapropiados. Por ejemplo, la actividad de la ciclina B1-Cdk1 durante el $G_2$ evita que una célula vuelva a replicar el DNA que ya se ha replicado antes en el ciclo celular (p. 527). Esto ayuda a garantizar que cada región del genoma se replique una vez, y solo una, por ciclo celular.

El desempeño de los diversos complejos de ciclina-Cdk mostrados en la figura 14-8*a*) han sido determinados por una amplia gama de estudios bioquímicos, llevados a cabo en células de mamíferos durante más de tres décadas. En los últimos años el desempeño de estas proteínas se ha reexaminado en ratones con bloqueo génico, con algunos resultados sorprendentes (figura 14-8*b*). Como se esperaba, el fenotipo de un ratón con bloqueo génico

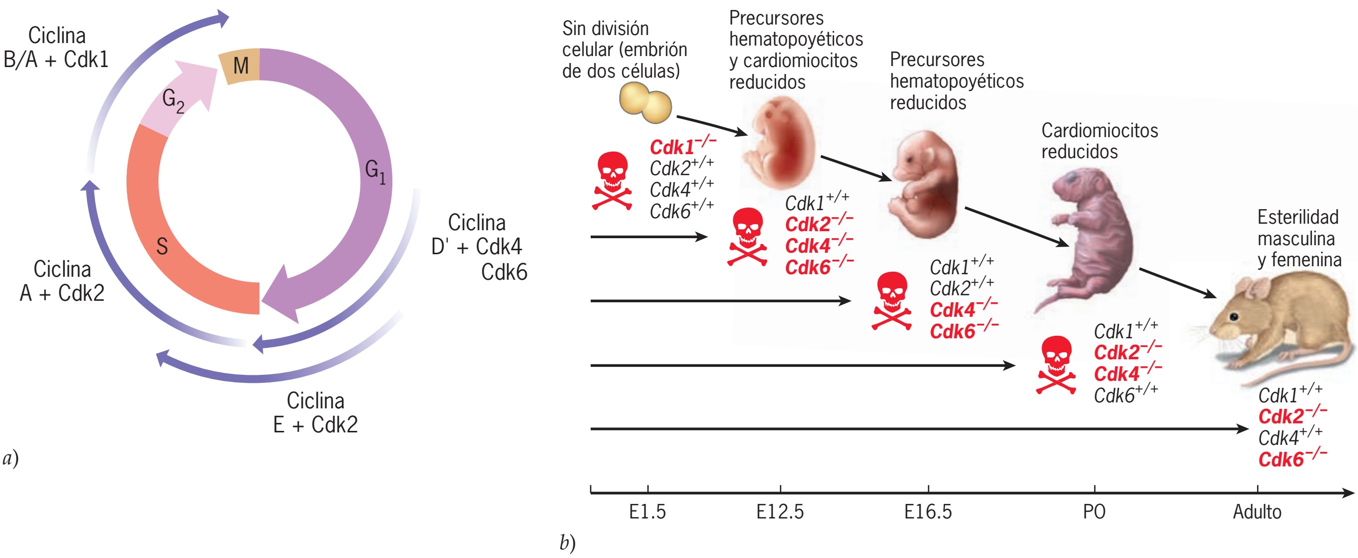



**FIGURA 14-8 Ciclina-Cdk en el ciclo celular de mamíferos.** *a*) Combinaciones entre diversas ciclinas y cinasas dependientes de ciclina en diferentes etapas en el ciclo celular de mamíferos. La actividad de Cdk durante el $G_1$ temprano es muy baja, lo que promueve la formación de complejos de prerreplicación en los orígenes de la replicación (véase figura 13-20). A mediados del $G_1$, la actividad de la Cdk es evidente debido a la asociación de las Cdk4 y Cdk6 con las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3). Entre los sustratos de estas Cdk se encuentra una proteína reguladora importante llamada pRb (sección 16.3, figura 16-12). La fosforilación de la pRb conduce a la transcripción de varios genes, incluidos los que codifican las ciclinas E y A, la Cdk1 y las proteínas implicadas en la replicación. La transición $G_1$-S, que incluye el inicio de la replicación, está dirigida por la actividad de los complejos ciclina E-Cdk2 y ciclina A-Cdk2. La transición de $G_2$ a M y el paso a M temprana se debe a la actividad secuencial de los complejos ciclina A-Cdk1 y ciclina B1-Cdk1, que fosforilan sustratos tan diversos como proteínas citoesqueléticas, histonas y proteínas de la envoltura nuclear. (La Cdk1 cinasa de mamíferos es equivalente a la cdc2 cinasa de levadura con fisión, y su inhibición y activación son similares a las indicadas en la figura 14-6). *b*) Los efectos de la deleción de genes que codifican varias Cdk sobre el desarrollo del ratón (mostrados en rojo). De las cuatro Cdk primarias de mamíferos, solo la Cdk1 es muy necesaria para la división celular. Los embriones que solo expresan la Cdk1 mueren durante el curso del desarrollo embrionario. Los ratones que expresan tanto la Cdk1 como la Cdk4 se desarrollan en adultos que son estériles, debido a defectos en los ciclos de células meióticas. E (*embryonic day number*): número de día embrionario; P (*postnatal day number*): número de día posnatal.

FUENTE: *a)* CJ Sherr. *Cell* 1993;73:1060; Cell for Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center. HA Coller. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2007;8:667. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* por el Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de *Nature* Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto vía Copyright Clearance Center*; b)* Malumbers y Barbacid. *Nat Revs Cancer* 2009;9:160, fig. 2. *Nature Reviews Cancer* by Nature Publishing Group. Reproducida con el permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Copyright Clearance Center.

particular depende del gen que se ha eliminado. Los ratones que no pueden sintetizar Cdk1, ciclina B1, ciclinas E1 y E2 o ciclina A2 mueren como embriones tempranos, lo que sugiere que las proteínas codificadas por estos genes son esenciales para un ciclo celular normal. Por el contrario, un embrión de ratón que carece de los genes que codifican *todas* las otras Cdk del ciclo celular (es decir, Cdk 2, 4 y 6) es capaz de desarrollar una etapa con órganos completamente formados, aunque el animal no sobrevive al nacimiento (figura 14-8*b*). Las células tomadas de tales embriones son capaces de proliferar en un cultivo, aunque más lentamente que las células normales. Este hallazgo indica que, como en la levadura, la Cdk1 es la única Cdk *requerida* para guiar una célula de mamífero a través de todas las etapas del ciclo celular. En otras palabras, aunque las otras Cdk normalmente se expresan en momentos específicos durante el ciclo celular de mamíferos, la Cdk1 puede "cubrir" su ausencia, asegurando que todos los sustratos requeridos sean fosforilados en cada etapa del ciclo celular. Este es un caso clásico de *redundancia*, en el cual una proteína puede llevar a cabo funciones que normalmente no realizaría. Aun así, la ausencia de una de estas ciclinas o Cdk "no esenciales" usualmente da como resultado anormalidades distintivas del ciclo celular, al menos en ciertos tipos de células. Los ratones que carecen de un gen para la ciclina D1, por ejemplo, son más pequeños que los animales de control, lo que se debe a una reducción en el nivel de división celular en todo el cuerpo. Además, los animales deficientes en ciclina D1 muestran una particular falta de proliferación celular durante el desarrollo de la retina. Los ratones que carecen de Cdk4 se desarrollan sin células productoras de insulina en el páncreas. Los ratones que carecen de Cdk2 parecen desarrollarse normalmente, pero exhiben defectos específicos durante la meiosis (figura 14-8*b*), lo que refuerza las importantes diferencias en la regulación de las divisiones mitótica y meiótica.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son las funciones respectivas de la CAK, Wee1 y Cdc25 en el control de la actividad de la Cdk en las células con fisión de levadura? ¿Cuál es el efecto de las mutaciones en los genes *wee1* o *cdc25* en estas células?

## 14.5 Control del ciclo celular: puntos de control, inhibidores Cdk y respuestas celulares

La *ataxia-telangiectasia* (AT, *ataxia-telangiectasia*) es un trastorno hereditario recesivo caracterizado por una serie de síntomas diversos, incluido un riesgo mucho mayor de ciertos tipos de cáncer.[2] A finales de la década de 1960, tras la muerte de varios individuos sometidos a radioterapia, se descubrió que los pacientes con AT son muy sensibles a la radiación ionizante (p. 531). También lo son las células de estos pacientes, que carecen de una respuesta protectora crucial que se encuentra en las células normales. Cuando estas se someten a tratamientos que dañan el DNA, como la radiación ionizante o las drogas que alteran el DNA, su progreso a lo largo del ciclo celular se detiene mientras se repara el daño. Por ejemplo, si se irradia una célula normal durante la fase $G_1$ del ciclo celular, se retrasa la progresión a la fase S. De forma similar, las células irradiadas en la fase S retrasan más la síntesis del DNA, mientras que las células irradiadas en el $G_2$ retrasan la entrada en la mitosis.

[2] Otros síntomas de la enfermedad incluyen la postura inestable (ataxia), resultante de la degeneración de las células nerviosas en el cerebelo, vasos sanguíneos dilatados en forma permanente en la cara y en otros lugares (telangiectasia), susceptibilidad a la infección, y células con un número anormalmente alto de aberraciones cromosómicas. La base de los primeros dos síntomas aún no se ha determinado.

Los estudios de este tipo llevados a cabo en levaduras dieron lugar al concepto formulado por Leland Hartwell y Ted Weinert en 1988 de que las células poseen **puntos de control** como parte de su ciclo celular. Los puntos de control son mecanismos de vigilancia que detienen el progreso del ciclo celular si 1) se daña alguno de los DNA cromosómicos o 2) ciertos procesos críticos no han sido completados de forma apropiada, como la replicación del DNA durante la fase S o el alineamiento cromosómico durante la fase M. Los puntos de control aseguran que cada uno de los diversos eventos que componen el ciclo celular ocurra de manera precisa y en el orden correcto. Muchas de las funciones de la maquinaria punto de control no tienen ningún rol en los eventos normales del ciclo celular, y solo se activan cuando aparece una anomalía. De hecho, los genes que codifican varias proteínas de punto de control se identificaron por primera vez en células de levadura mutantes, que continuaron su progreso a lo largo del ciclo celular a pesar de sufrir daños en el DNA —u otras anomalías— que causaron defectos graves.

Los puntos de control se activan durante todo el ciclo celular mediante un sistema de sensores que reconocen el daño en el DNA o las anormalidades celulares. Si un sensor detecta la presencia de un defecto, desencadena una respuesta que detiene temporalmente el progreso del ciclo celular. La célula puede usar el retraso para reparar el daño o corregir el defecto, en lugar de continuar hacia la siguiente etapa. Esto es muy importante porque las células de mamíferos que sufren división con daño genético corren el riesgo de transformarse en una célula cancerosa. Si el DNA se daña irreparablemente, el mecanismo de punto de control puede transmitir una señal que conduce ya sea 1) a la muerte de la célula o 2) a su conversión a un estado de detención permanente del ciclo celular (conocido como senescencia).

Hemos visto en numerosas partes de este texto, cómo el estudio de una extraña enfermedad humana ha llevado a un descubrimiento de importancia básica en la biología celular y molecular. La respuesta al daño del DNA de la célula proporciona otro ejemplo de este camino al descubrimiento. El gen responsable de la ataxia-telangiectasia (el gen *ATM*) codifica una proteína cinasa (serina/treonina cinasa) que se activa por ciertas lesiones del DNA, particularmente las roturas de la doble hebra (p. 534). Resulta sorprendente que la presencia de una sola ruptura en una de las moléculas de DNA de la célula sea suficiente para causar una rápida y gran activación de las moléculas de ATM, lo que provoca la detención del ciclo celular. Una proteína cinasa relacionada, llamada ATR, también se activa por roturas del DNA y otros tipos de lesiones, incluidas las resultantes de la replicación incompleta del DNA o la radiación UV. Tanto la ATM como la ATR son parte de múltiples complejos proteicos capaces de unirse a la cromatina que contiene DNA dañado. Una vez vinculadas, la ATM y la ATR pueden fosforilar una notable variedad de proteínas que participan en los puntos de control del ciclo celular y en la reparación del DNA.

¿Cómo detiene una célula su progreso de una etapa del ciclo celular al siguiente? Examinaremos brevemente dos vías bien estudiadas, que están disponibles para las células de mamíferos para detener su ciclo celular en respuesta al daño en el DNA.

1. Si una célula que se prepara para ingresar a la mitosis es sometida a irradiación UV, la ATR cinasa se activa y la célula se detiene en el $G_2$. Se cree que las moléculas de ATR cinasa se reclutan en sitios de DNA monocatenario recubierto de proteína (paso 1, **FIGURA 14-9**) como las presentes, mientras se repara el DNA dañado por la UV (figura 13-25). La ATR fosforila y activa un punto de control cinasa, llamado Chk1 (paso 2), que a su vez fosforila la Cdc25 en un residuo de serina particular (paso 3), convirtiendo a la molécula Cdc25 en objetivo para una proteína especial adaptadora que se une a la Cdc25 en el citoplasma (pasos 4,5). Esta interacción inhibe la actividad fosfatasa de la Cdc25 y evita que se reimporte

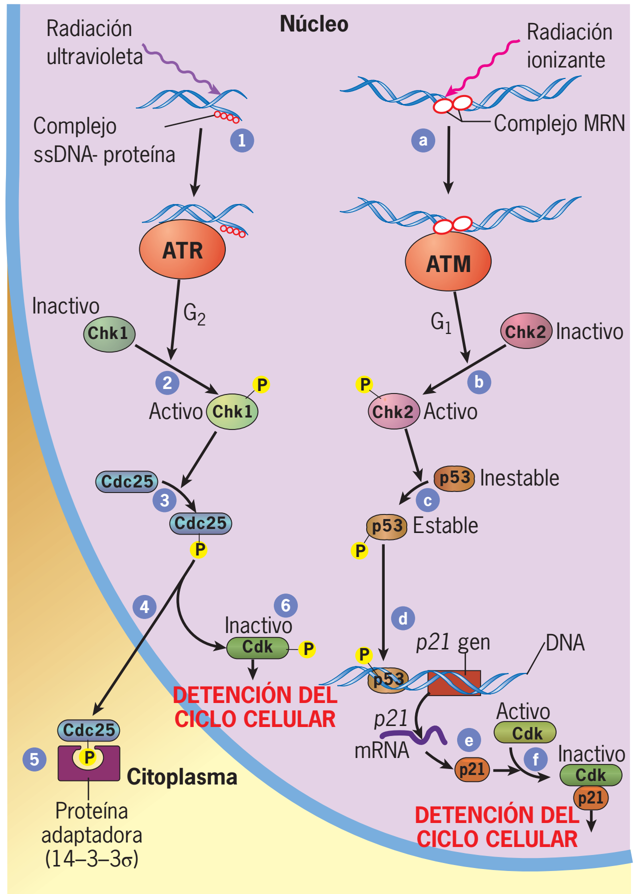



**FIGURA 14-9 Modelos para el mecanismo de acción de dos puntos de comprobación de daños del DNA.** La ATM y ATR son proteínas cinasas que se activan después de tipos específicos de daño en el DNA. Cada una de estas proteínas actúa a través de puntos de referencia, que señalan vías que conducen a la detención del ciclo celular. La ATM se activa en respuesta a las roturas de doble hebra, que son detectadas por el complejo de proteína MRN (paso a). La ATR, por otro lado, se activa con DNA recubierto de proteína (paso 1) que se forma cuando las horquillas de replicación se estancan, o el DNA se repara después de varios tipos de daños. En la vía $G_2$ mostrada aquí, la ATR fosforila y activa el punto de control cinasa Chk1 (paso 2), que fosforila e inactiva la fosfatasa Cdc25 (paso 3), que normalmente se desplaza entre el núcleo y el citoplasma (paso 4). Una vez fosforilada, la Cdc25 está unida por una proteína adaptadora en el citoplasma (paso 5), y no puede ser reimportada en el núcleo, lo que deja a la Cdk en su estado fosforilado inactivado (paso 6). En la vía $G^1$ mostrada aquí, la ATM fosforila y activa el punto de control cinasa Chk2 (paso b), que fosforila el p53 (paso c). La p53 es normalmente de vida muy corta, pero la fosforilación de la Chk2 estabiliza la proteína, lo que mejora su capacidad para activar la transcripción *p21* (paso d). Una vez transcrito y traducido (paso e), el factor p21 inhibe de forma directa la Cdk (paso f). Muchas otras proteínas, incluidas las enzimas modificadoras de histonas, los complejos de remodelación de la cromatina y las variantes de histonas participan en la mediación de la respuesta al daño del DNA, pero no se discuten.

FUENTE: Véase *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:245; *Nature Revs Mol Cell Biol* 2009;10:243; *Nature Cell Biol* 2011;13:1161; y *Genes Develop* 2011;25:409.

en el núcleo. Como se discutió en la página 547, la Cdc25 normalmente realiza un papel clave en la transición $G_2$/M mediante la eliminación de los fosfatos inhibidores de la Cdk1. Por tanto, la ausencia de la Cdc25 del núcleo deja la Cdk en un estado inactivo (paso 6) y la célula se detiene en $G_2$.

2. El daño al DNA también conduce a la síntesis de proteínas que inhiben directamente el complejo Cdk-ciclina que impulsa el ciclo celular. Por ejemplo, las células expuestas a radiación ionizante en $G_1$ sintetizan una proteína llamada p21 (masa molecular 21 kDa) que inhibe la actividad cinasa de la Cdk del $G_1$. Esto evita que las células fosforilen los sustratos clave y entren en la fase S. La ATM está involucrada en este mecanismo de punto de control. En esta respuesta particular de daño al DNA, las rupturas en el DNA que son causadas por la radiación ionizante sirven como sitios para el reclutamiento de un complejo proteico denominado MRN (paso a, figura 14-9). Este se puede considerar como un sensor de roturas del DNA. El MRN recluta y activa la ATM, que fosforila y activa otra cinasa de punto de control llamada Chk2 (paso b). La Chk2 a su vez fosforila un factor de transcripción (p53) (paso c), que conduce a la transcripción y traducción del gen *p21* (paso f) y posterior inhibición de la Cdk (paso f). Alrededor de 50% de todos los tumores humanos muestran evidencia de mutaciones en el gen que codifica el p53, lo que refleja su importancia en el control del crecimiento celular. El papel del p53 se discute en detalle en el capítulo 16.

El p21 es solo uno de por lo menos siete inhibidores conocidos de la Cdk. La interacción entre un inhibidor de Cdk relacionado (p27) y uno de los complejos de Cdk-ciclina se muestra en la **FIGURA 14-10*a***). En este modelo estructural la molécula p27 se




*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 14-10 El p27: un inhibidor de Cdk que detiene la progresión del ciclo celular.** *a*) Estructura tridimensional de un complejo entre el p27 y la ciclina A-Cdk2. La interacción con el p27 altera la conformación de la subunidad catalítica Cdk, inhibiendo su actividad de proteína cinasa. *b*) Un par de hermanos de camada a las 12 semanas de edad. Además de poseer diferentes genes para el color del pelaje, el ratón con pelaje oscuro ha sido modificado genéticamente para que carezca de ambas copias del gen *p27* (denotadas p27-/-), lo que explica su mayor tamaño. *c*) Comparación de las glándulas del timo de un ratón normal (izquierda) y un ratón $p27^{-/-}$(derecha). La glándula del ratón *p27* con bloqueo génico es mucho más grande, a causa de un mayor número de células.

FUENTE: *a*) Alicia A Russo, *et al*. *Nature* 1996;382:327, fig. 2a. Cortesía de Nikola Pavletich, Instituto Médico Howard Hughes; reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited; *b*) Keiko Nakayama, *et al*. Cortesía de Kei-ichi Nakayama. *Cell* 1996;85:710-711; con permiso de Elsevier; *c*) de Keiko Nakayama, *et al*. Cortesía de Kei-ichi Nakayama. *Cell* 1996;85:710-711; con permiso de Elsevier.

cubre a sí misma mediante ambas subunidades del complejo ciclina A-Cdk2, cambiando la conformación de la subunidad catalítica e inhibiendo su actividad de cinasa. En muchas células la p27 se debe fosforilar, y luego degradarse, antes de que se produzca la progresión a la fase S.

Los inhibidores de la Cdk, como el p21 y p27, son también activos en la diferenciación celular. Justo antes de que las células comiencen a diferenciarse, ya sea en células intestinales, hepáticas, sanguíneas o de otro tipo, por lo general se retiran del ciclo celular y dejan de dividirse. Se cree que los inhibidores de la Cdk permiten o inducen directamente la retirada del ciclo celular. Del mismo modo que las funciones de las Cdk y ciclinas específicas se han estudiado en ratones con bloqueo génico, también se han estudiado sus inhibidores. Los que carecen del gen *p27* muestran un fenotipo distintivo: son más grandes de lo normal (figura 14-10*b*) y ciertos órganos, como el timo y el bazo, contienen un número significativamente mayor de células que las de un animal normal (figura 14-10*c*). En los ratones normales las células de estos órganos particulares sintetizan niveles relativamente altos de p27, y se presume que la ausencia de esta proteína en los animales con el p27 deficiente permite que las células se dividan muchas veces más antes de diferenciarse.

**REPASO**

1. ¿Qué se entiende por punto de control del ciclo celular? ¿Cuál es su importancia? ¿Cómo detiene una célula su progreso en uno de estos puntos de control?

## 14.6 Descripción general de la fase M: mitosis y citocinesis

Mientras que nuestra comprensión de la regulación del ciclo celular descansa en gran medida en estudios genéticos en la levadura, nuestro conocimiento de la fase M se basa en más de un siglo de investigación microscópica y bioquímica en animales y plantas. El nombre "mitosis" proviene de la palabra griega *mitos*, que significa "hebra". El nombre fue acuñado en 1882 por el biólogo alemán Walther Flemming para describir los cromosomas filiformes que misteriosamente aparecían en las células animales, justo antes de dividirse en dos. La belleza y la precisión de la división celular se aprecian al observar un video del proceso, hecho con técnica *time-lapsed*, en lugar de leerlo en un libro de texto (p. ej., www.bio.unc.edu/faculty/salmon/lab/mitosis/mitosismovies.html).

La *mitosis* es un proceso de división nuclear en el que las moléculas de DNA replicadas de cada cromosoma se reparten con exactitud en dos núcleos. La mitosis suele ir acompañada de *citocinesis*, un proceso mediante el cual una célula en división se divide en dos, dividiendo el citoplasma en dos paquetes celulares. Las dos células hijas que resultan de la mitosis y la citocinesis poseen un contenido genético idéntico entre sí y la célula madre de la cual surgieron. La mitosis, por tanto, mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para el crecimiento y mantenimiento de un organismo. La mitosis puede tener lugar tanto en células haploides como diploides. Las células mitóticas haploides se encuentran en hongos, gametofitos de plantas y algunos animales (incluidas las abejas machos, conocidas como zánganos). La mitosis es una etapa del ciclo celular donde la célula desvía virtualmente toda su energía a una sola actividad: la segregación de cromosomas. Como resultado, la mayoría de las actividades metabólicas de la célula, incluida la transcripción y la traducción, se reducen durante la mitosis, y la célula se vuelve relativamente insensible a los estímulos externos.

Hemos visto en capítulos anteriores cuánto se puede aprender sobre los factores responsables de un proceso particular al estudiarlo fuera de una célula viva (p. 263). Nuestra comprensión de la bioquímica de la mitosis ha sido auxiliada por el uso de extractos preparados a partir de huevos de rana. Estos contienen arsenales de todos los materiales necesarios para apoyar la mitosis (histonas, tubulina, etc.). Cuando se añade cromatina o núcleos enteros al extracto de huevo, la cromatina se compacta en cromosomas mitóticos, que se segregan mediante un huso mitótico que se ensambla de manera espontánea dentro de la mezcla libre de células. En muchos experimentos el desempeño de una proteína particular en la mitosis se puede estudiar eliminando esa proteína del extracto de huevo, mediante la adición de un anticuerpo (inmunoagotamiento) y determinando si el proceso puede continuar en ausencia de esa sustancia (véase figura 14-21 para un ejemplo).

La mitosis por lo general se divide en cinco etapas (**FIGURA 14-11**), *profase, prometafase, metafase, anafase* y *telofase*, cada una caracterizada por una particular serie de eventos. Tenga en cuenta que cada una de estas etapas representa un segmento de un proceso continuo; la división de la mitosis en fases arbitrarias se hace solo para el debate y la experimentación.

**REPASO**

1. ¿Qué ocurre durante la etapa mitótica del ciclo celular? ¿Qué sucede durante la citocinesis?

## 14.7 Profase

Durante la primera etapa de la mitosis, la **profase**, los cromosomas duplicados se preparan para la separación y se ensambla la maquinaria mitótica.

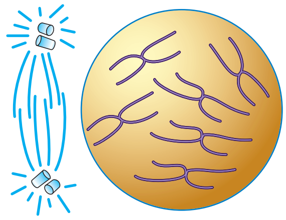
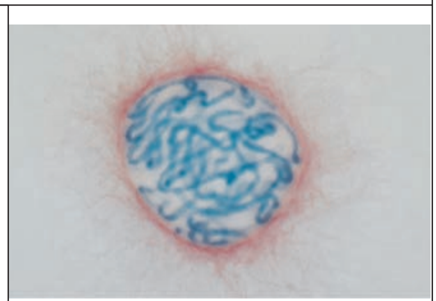
### Formación del cromosoma mitótico

El núcleo de una célula interfásica contiene enormes longitudes de fibras de cromatina. El estado extendido de la cromatina interfásica es ideal para los procesos de transcripción y replicación, pero no para la segregación en dos células hijas. Antes de segregar sus cromosomas, una célula los convierte en estructuras mucho más cortas y gruesas mediante un notable proceso de **compactación cromosómica** (o **condensación cromosómica**), que se produce durante la profase temprana (figuras 14-11 y **14-12**).

Como se describe en la página 467, la cromatina de una célula interfásica está organizada en fibras de casi 30 nm de diámetro. Aunque existe polémica sobre este tema, se cree que los cromosomas mitóticos se han formado a partir de similares tipos de fibras, como se observa en el examen por microscopía electrónica en los cromosomas completos aislados a partir de células mitóticas (**FIGURA 14-13*a***). De acuerdo con este punto de vista, la compactación cromosómica no altera la naturaleza de la fibra de cromatina, sino la forma en que se empaqueta. El tratamiento de los cromosomas mitóticos con soluciones que solubilizan las histonas, y la mayoría de las proteínas no histónicas, revela una armazón estructural o andamiaje que conserva la forma básica del cromosoma intacto (figura 14-13*b*). Los lazos de DNA están unidos en su base a las proteínas no histónicas que forman este andamiaje cromosómico (se muestra con mayor aumento en la figura 12-15).

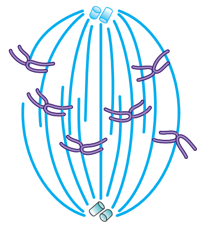
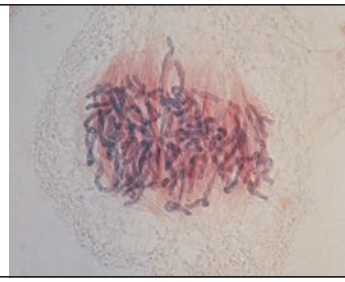
### Profase

1. El material cromosómico se condensa para formar cromosomas mitóticos compactos. Se ve que los cromosomas están compuestos de dos cromátidas unidas juntas en el centrómero.
2. Se desensambla el citoesqueleto y se ensambla el huso mitótico.
3. Complejo de Golgi y fragmento de retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*). La envoltura nuclear se dispersa.

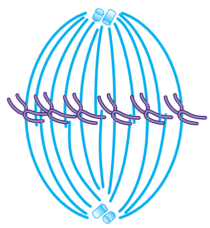
### Prometafase

1. Los microtúbulos cromosómicos se unen a los cinetocoros de los cromosomas.
2. Los cromosomas se mueven al ecuador del huso.

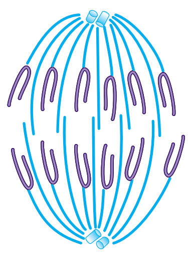
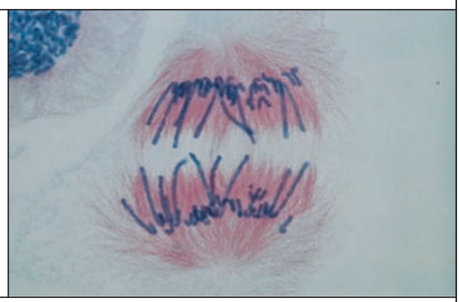
### Metafase

1. Los cromosomas están alineados a lo largo de la placa metafásica, unidos por microtúbulos cromosómicos a ambos polos.




### Anafase

1. Los centrómeros se dividen, y las cromátidas se separan.
2. Los cromosomas se mueven a los polos opuestos del huso.
3. Los polos del huso se separan.

### Telofase

1. Los cromosomas se agrupan en los polos opuestos del huso.
2. Los cromosomas se dispersan.
3. La envoltura nuclear se ensambla alrededor de los cúmulos de cromosomas.
4. El complejo de Golgi y el ER se reforman.
5. Células hijas formadas por citocinesis.

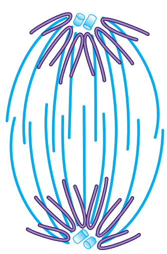
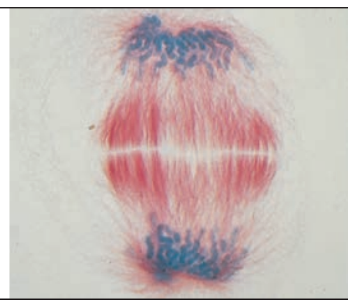



**FIGURA 14-11 Las etapas de la mitosis en una célula animal (dibujos a la izquierda) y una célula vegetal (fotos a la derecha).**
FUENTE: Micrografías cortesía de Andrew Bajer.

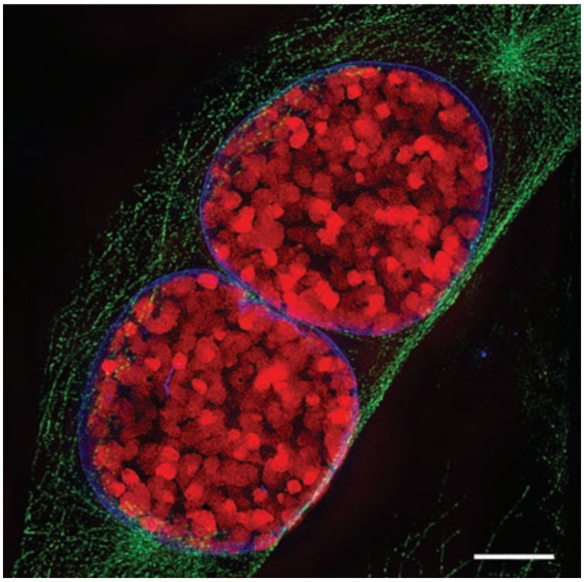


**FIGURA 14-12 Morfología de la profase nuclear.** Sección óptica-luminosa a través de dos núcleos de células de ratón en la profase, registrada con microscopía de iluminación de superresolución 3D-estructurada (3D-SIM, *structured illumination microscopy*). Los cromosomas condensados se muestran en rojo, la envoltura nuclear en azul y los microtúbulos en verde. La barra de escala es de 5 mm.

FUENTE: Cortesía de Lothar Schermelleh.

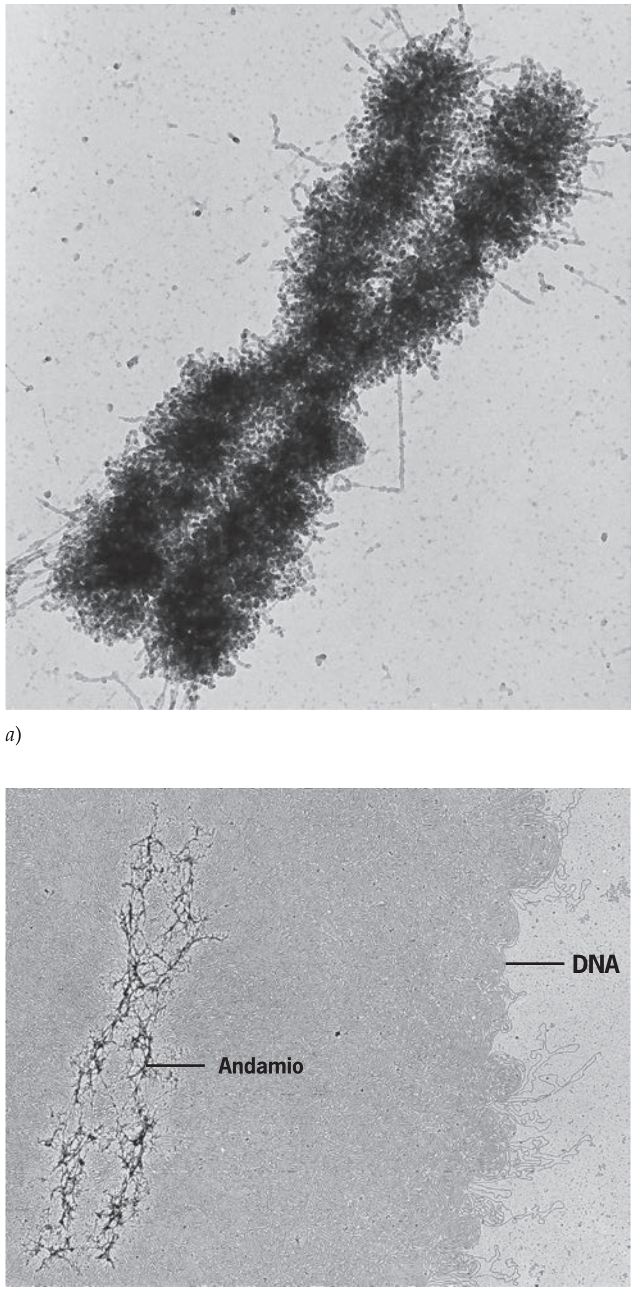



**FIGURA 14-13 El cromosoma mitótico.** *a*) Microfotografía electrónica de una preparación de montaje total de un cromosoma mitótico humano. La estructura se ve compuesta por una fibra nudosa de 30 nm de diámetro, la cual es similar a la que se encuentra en los cromosomas de interfase. *b*) Aspecto de un cromosoma mitótico después de que las histonas y la mayoría de las proteínas no histónicas han sido eliminadas. Las proteínas residuales forman un andamio del cual se observa que emergen lazos de DNA (estos se muestran más claramente en la figura 12-15).

FUENTE: *a*) Cortesía de Gunther F Bahr, Instituto de Física de las Fuerzas Armadas, Washington, DC *b*) De James R Paulson y Ulrich K Laemmli. *Cell* 1977;12:820, con el permiso de Elsevier.

La investigación sobre la compactación cromosómica se ha centrado en un abundante complejo multiproteico llamado *condensina*. Las proteínas de la condensina se descubrieron incubando núcleos en extractos de huevo de rana e identificando aquellas proteínas que se asociaban con los cromosomas y se compactaban. La eliminación de la condensina de los extractos evitó la compactación cromosómica normal. ¿Cómo es que la condensina es capaz de inducir cambios tan drásticos en la arquitectura de la cromatina? Hay muy pocos datos disponibles de estudios *in vivo* para responder a esta pregunta, aunque existe mucha especulación al respecto.

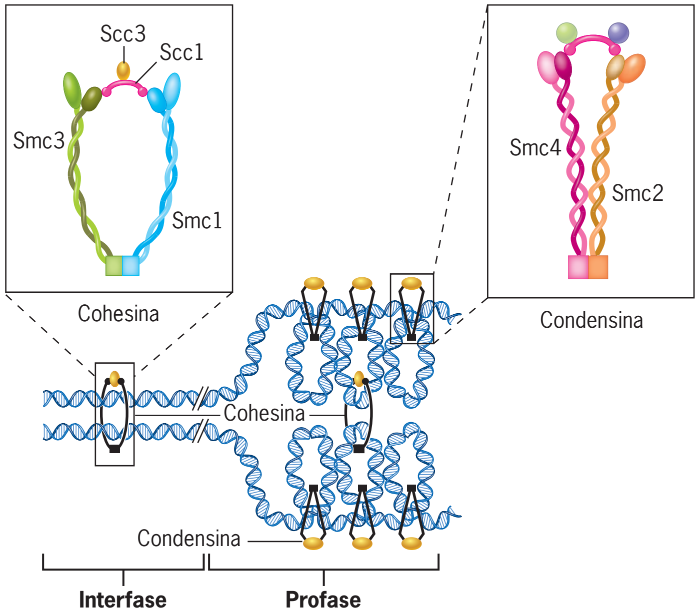
El DNA superenrollado ocupa un volumen mucho más pequeño que el DNA relajado (véase figura 10-13), y los estudios sugieren que el DNA superenrollado desempeña un papel clave en la compactación de una fibra de cromatina en el pequeño volumen ocupado por un cromosoma mitótico. En presencia de una topoisomerasa y ATP, la condensina es capaz de unirse al DNA *in vitro* y enrollar el DNA en rizos superplegados positivamente. Este hallazgo encaja muy bien con la observación de que la compactación cromosómica en la profase requiere de la topoisomerasa II, que junto con la condensina está presente como parte del andamiaje mitótico de cromosomas (figura 14-13*b*). En la figura 14-14 se muestra un modelo especulativo para la acción de la condensina. La condensina se activa al inicio de la mitosis por la fosforilación de varias de sus subunidades por la Cdk-ciclina, responsable de conducir las células del $G_2$ a la mitosis. Así, la condensina es uno de los objetivos a través de los cuales los Cdk pueden iniciar actividades de ciclo celular. La estructura de la subunidad de una molécula de condensina en forma de V se muestra en el recuadro derecho de la **FIGURA 14-14**.

Como resultado de la compactación, los cromosomas de una célula mitótica aparecen como estructuras diferenciadas, similares a varillas. El examen detallado de los cromosomas mitóticos revela que cada uno de ellos está compuesto por dos **cromátidas** "hermanas" de imagen especular (figura 14-13*a*). Las cromátidas hermanas son resultado de la replicación en la interfase previa.

Previo a la replicación, el DNA de cada cromosoma interfásico se asocia en sitios a lo largo de su longitud con un complejo multiproteico llamado **cohesina** (figura 14-14). Tras la replicación la cohesina mantiene las dos cromátidas hermanas unidas continuamente a través del $G_2$ y la mitosis, cuando se separan. Como se indica en los recuadros de la figura 14-14, la condensina y la cohesina tienen una organización estructural similar. Varios experimentos apoyan la hipótesis de que el anillo de cohesina rodea dos moléculas de DNA hermanas, como se muestra en las partes izquierda y derecha de la figura 14-14.

En los vertebrados, la cohesina se libera de los cromosomas en dos etapas diferentes. La mayor parte de la cohesina se elimina

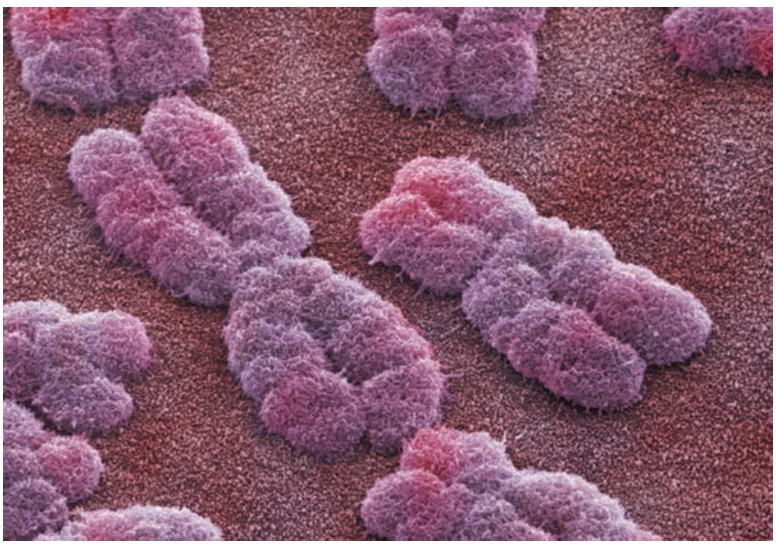
**FIGURA 14-14 Modelo para las funciones de la condensina y la cohesina en la formación de cromosomas mitóticos.** Justo después de la replicación, las hélices de DNA de un par de cromátidas hermanas se mantendrían asociadas por moléculas de cohesina que rodeaban las hélices de DNA hermanas, como se muestra a la izquierda del dibujo. A medida que la célula entre en la mitosis, comenzaría el proceso de compactación asistido por las moléculas de condensina, como se muestra en la parte derecha del dibujo. En este modelo se muestra cómo la condensación provoca la compactación cromosómica, formando arcos alrededor de bucles superenrollados de DNA dentro de la cromatina. Las moléculas de cohesina continuarían uniendo el DNA de las cromátidas hermanas. Se propone (pero no se muestra en este dibujo) que las interacciones cooperativas entre las moléculas de condensina organizarían los lazos superenrollados en bobinas más grandes, que luego se doblarían en una fibra cromosómica mitótica. Las inserciones superior izquierda y derecha muestran la estructura de la subunidad de un complejo de cohesina y condensina, respectivamente. Ambos complejos están construidos alrededor de un par de subunidades SMC. Cada uno de los polipéptidos SMC se pliega sobre sí mismo para formar una tira enrollada antiparalela, muy elongada, con un dominio globular ATP-enlazante, donde los terminales N y C se unen. La cohesina y la condensina también tienen dos o tres subunidades no SMC que completan la estructura en forma de anillo de estas proteínas.



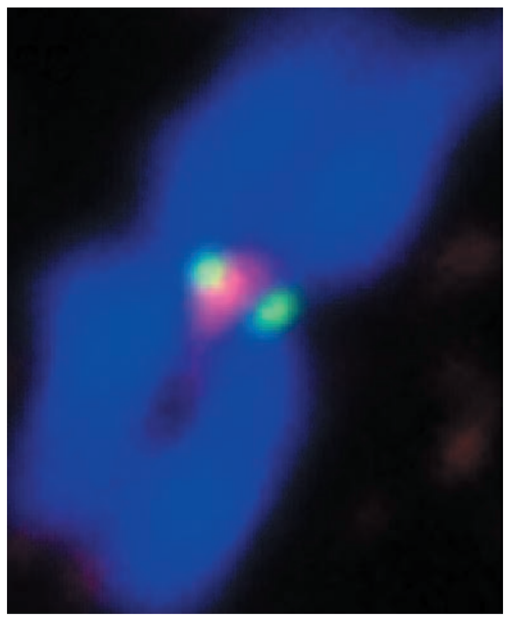

de los brazos de los cromosomas a medida que se compactan durante la profase. La disociación es inducida por la fosforilación de las proteínas asociadas a la cohesina por dos enzimas mitóticas importantes, llamadas cinasa tipo Polo y Aurora B cinasa. Las cohesinas asociadas se retiran luego de los brazos del cromosoma mediante la acción de la proteína WAPL. A raíz de este evento, las cromátidas de cada cromosoma mitótico se sujetan relativamente desligadas a lo largo de sus brazos extendidos, pero mucho más apretadas en sus centrómeros [figura 14-13*a*) y **FIGURA 14-15**]. La cohesina permanece en los centrómeros, debido a la presencia allí de una fosfatasa que elimina los grupos fosfato añadidos a la proteína por las cinasas. La liberación de la cohesina desde los centrómeros normalmente se retrasa hasta la anafase, como se describe en la página 562, y está mediada por la proteína separasa. Si la fosfatasa se inactiva mediante el experimento, las cromátidas hermanas se separan prematuramente una de la otra antes de la anafase.

## Centrómeros y cinetocoros

El punto de referencia más notable de un cromosoma mitótico es una indentación o *constricción primaria* que marca la posición del centrómero (figura 14-13*a*). El centrómero es la residencia de secuencias de DNA muy repetidas (véase figura 10-20), que sirven



*a*)



*b*)

**FIGURA 14-15 Cada cromosoma mitótico está compuesto por un par de cromátidas hermanas conectadas entre sí por el complejo de proteína cohesina.** *a*) Micrografía electrónica de barrido coloreada de varios cromosomas en metafase, que muestra las cromátidas idénticas emparejadas asociadas de forma suelta a lo largo de su longitud y unidas estrechamente en el centrómero. Las cromátidas no se separan entre sí hasta la anafase. *b*) Microfotografía de fluorescencia de un cromosoma metafásico en una célula humana cultivada. El DNA está teñido de azul, los cinetocoros son verdes y la cohesina es roja. En esta etapa de la mitosis la cohesina se ha perdido de los brazos de las cromátidas hermanas, pero permanece concentrada en los centrómeros, donde las dos hermanas están estrechamente unidas.

FUENTE: *a*) Andrew Syred/Photo Researchers, Inc; *b*) por S Hauf y Jan-Michael Peters. *Nature Cell Biol* 2001;3:E17, fig. 1c. Reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Limited.

como sitios de unión para proteínas específicas. El examen de las secciones a través de un cromosoma mitótico revela la presencia de una estructura proteinácea parecida a un botón, llamada **cinetocoro**, en la superficie externa del centrómero de cada cromátida (**FIGURA 14-16*a*, *b***). La mayoría de las más de 100 proteínas que componen el cinetocoro se ensamblan en el centrómero durante la profase temprana. Se piensa que las proteínas cinetocoras se reclutan en el centrómero debido a la presencia allí de los nuevos nucleosomas que contienen la variante de histonas CENP-A (p. 477). Como se explicará en breve, el cinetocoro funciona como 1) el sitio de fijación del cromosoma a los microtúbulos dinámicos del huso mitótico (como en la figura 14-30), 2) la residencia de varias proteínas motoras implicadas en la motilidad cromosómica (figura 14-16*c*) y 3) un componente clave en la ruta de señalización de un punto de control mitótico importante (véase figura 14-31).

## Formación del huso mitótico

Discutimos en el capítulo 9 cómo el ensamblaje de microtúbulos en las células animales es iniciado por una estructura especial organizadora de microtúbulos, el **centrosoma** (sección 9.5). Mientras una célula progresa más allá de $G_2$ y hacia la mitosis, los microtúbulos del citoesqueleto transitan por una dispersión generalizada, en preparación para su reensamblaje como componentes de una máquina compleja de microtamaño llamada **huso mitótico**. Se piensa que la rápida dispersión del citoesqueleto en la interfase se logra mediante la inactivación de proteínas que estabilizan los microtúbulos (p. ej., proteínas asociadas a microtúbulos o MAP, *microtubule-associated proteins*) y la activación de proteínas que desestabilizan estos polímeros.

Para comprender la formación del huso mitótico es necesario examinar primero el *ciclo del centrosoma*, a medida que progresa de acuerdo con el ciclo celular (**FIGURA 14-17*a***). Cuando una célula animal sale de la mitosis, el citoplasma contiene un solo centrosoma que contiene dos centríolos, los cuales se encuentran en ángulo recto entre sí. Incluso, antes de que se haya completado la citocinesis, los dos centríolos de cada célula hija pierden su asociación cercana entre sí (se dice que "se desacoplan"). Este evento es desencadenado por la enzima separasa, que se activa tarde en la mitosis (p. 562) y divide un enlace proteico que mantiene juntos a los centríolos. Luego, cuando la replicación del DNA comienza en el núcleo al inicio de la fase S, cada centríolo del centrosoma inicia su "replicación" en el citoplasma. El proceso comienza con la aparición de un pequeño *procentríolo* al lado de cada centríolo preexistente (materno) y orientado en ángulo recto con él (figura 14-17*b*). La elongación subsiguiente de los microtúbulos convierte cada procentríolo en un centríolo hijo de tamaño completo. Al comienzo de la mitosis el centro se divide en dos centrosomas adyacentes, cada uno de los cuales contiene un par

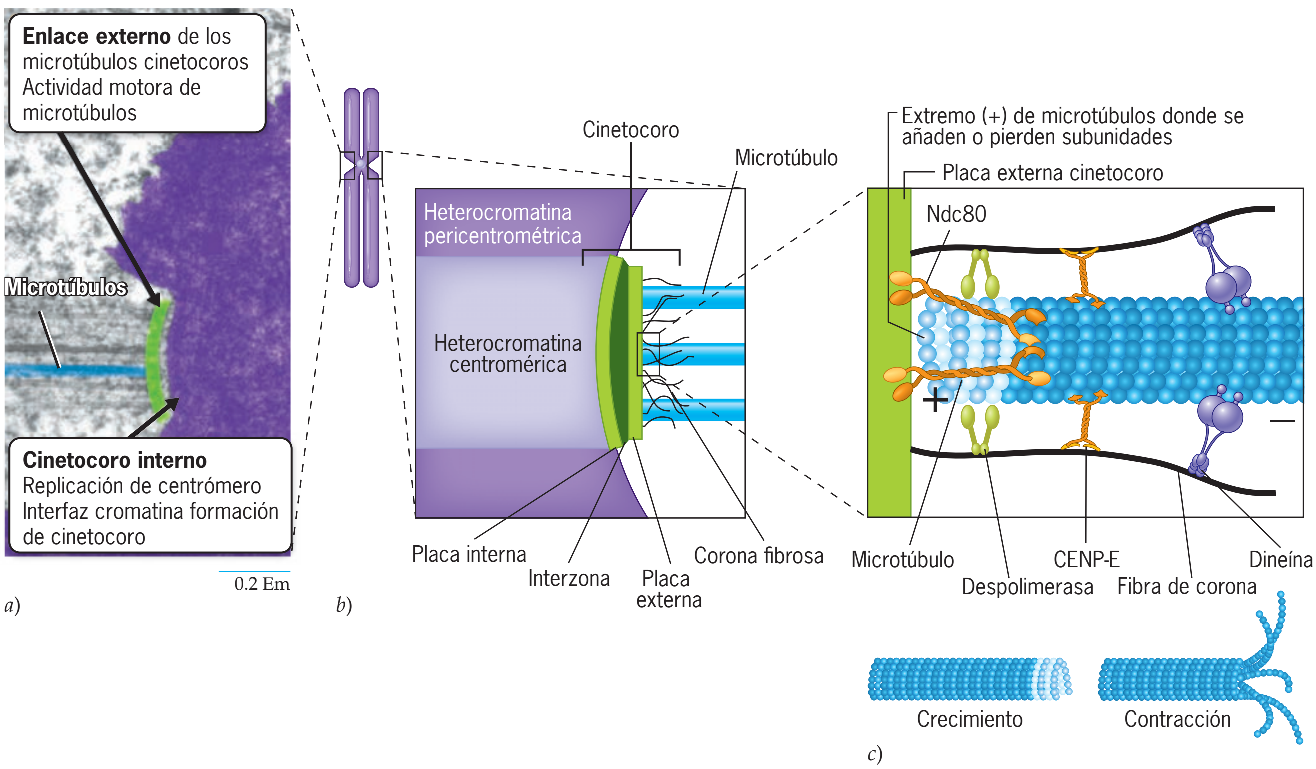
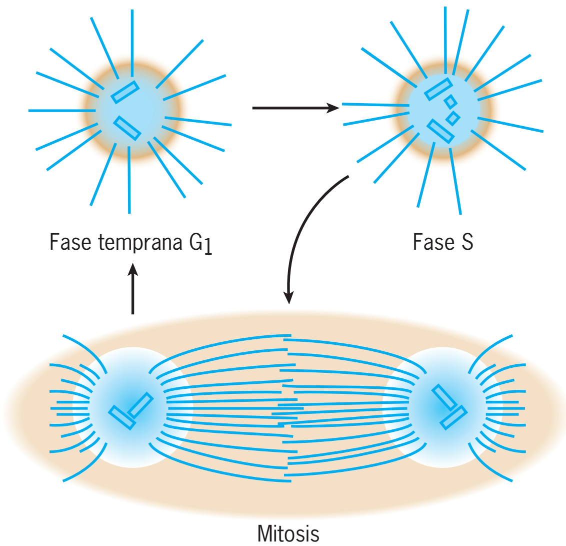
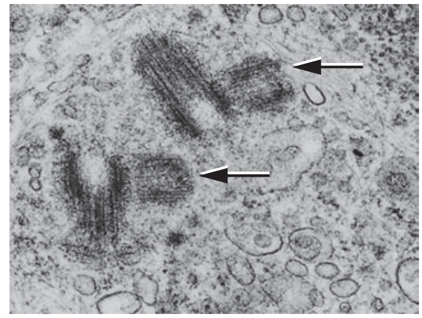



**FIGURA 14-16 El cinetocoro.** *a*) Micrografía electrónica de una sección a través de uno de los cinetocoros de un cromosoma en metafase de mamífero, que muestra su estructura de tres capas (trilaminar). Se puede ver que los microtúbulos del huso mitótico terminan en el cinetocoro. *b*) Representación esquemática del cinetocoro, que contiene una placa interna y externa densa en electrones, separada por una interzona ligeramente teñida. Las funciones propuestas de las placas interiores y exteriores se indican en la parte *a*). La placa interna contiene una variedad de proteínas unidas a la heterocromatina centromérica del cromosoma. Asociada con la placa externa está la corona fibrosa, que se une a las proteínas motoras implicadas en el movimiento cromosómico. *c*) Un modelo esquemático que muestra una disposición propuesta de varias de las proteínas encontradas en la superficie externa del cinetocoro. Entre las proteínas motoras asociadas con el cinetocoro, la dineína citoplásmica se mueve hacia el extremo negativo de un microtúbulo, mientras que la CENP-E se mueve hacia el extremo positivo. Estos motores también pueden desempeñar un papel en el anclaje de los microtúbulos al cinetocoro. La proteína etiquetada como "despolimerasa" es un miembro de la superfamilia de cinesinas, que funciona en la despolimerización de los microtúbulos más que en la motilidad. En este dibujo las despolimerasas están en un estado inactivo (los microtúbulos no se despolimerizan). La Ndc80 es un complejo de proteínas que consiste en cuatro subunidades de proteínas diferentes, que forman una molécula en forma de bastón de 57 nm de longitud, que se extiende hacia afuera del cuerpo del cinetocoro. Los dominios globulares en cualquier extremo del complejo median la unión al microtúbulo y al cinetocoro. Estas fibrillas Ndc80 han sido implicadas como acopladoras del cinetocoro en el extremo positivo de un microtúbulo dinámico.

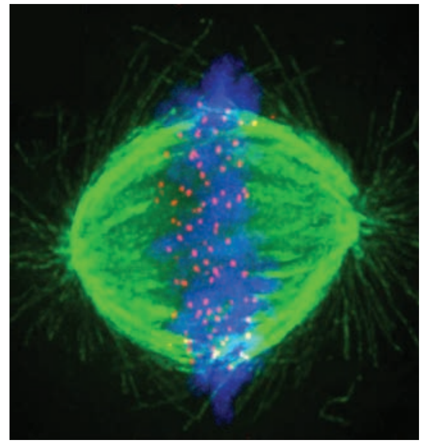
FUENTE: *a*) Don W Cleveland, UCSD, *et al*. *Cell* 2003;112:408, fig. 1c, con permiso de Elsevier. Imagen cortesía de Kevin Sullivan.



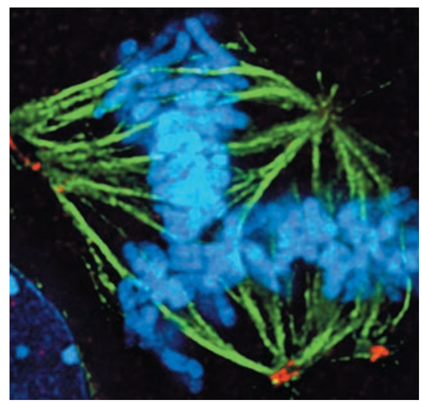

*a*)



*b*) 0.3 µm



*c*)



*d*)

**FIGURA 14-17 El ciclo del centrosoma de una célula animal.** *a*) Durante el G1 el centrosoma contiene un solo par de centríolos, que ya no están asociados tan apretadamente como lo fueron durante la mitosis. Durante la fase S los procentríolos hijo se forman adyacentes a centríolos maternos, de modo que dos pares de centríolos se hacen visibles dentro del centrosoma (véase *b*). Los procentríolos hijos continúan alargándose durante la fase G2, y al comienzo de la mitosis, el centrosoma se divide, y cada par de centríolos se convierte en parte de su propio centrosoma. A medida que se separan, los centrosomas organizan las fibras de los microtúbulos que forman el huso mitótico. *b*) Se ve que el centrosoma de esta célula contiene dos centríolos madre, cada uno con un procentro descendente asociado (flechas). *c*) Microfotografía de fluorescencia de un eje normal en metafase temprana, teñida para los microtúbulos (verde), cromosomas (azul) y proteína cinetocoro (rojo). *d*) Esta célula de cáncer de mama de ratón contiene más que el complemento normal de dos centrosomas (rojo), y ha ensamblado un aparato de eje multipolar (verde). Los centrosomas adicionales conducen a una mala segregación cromosómica y a un número anormal de cromosomas (azul), que son característicos de las células malignas.

FUENTE: *a*) DR Kellogg, *et al*. Reproducida con permiso de la *Annual Review of Biochemistry* 1994;(63); copyright 1994, Annual Review of Biochemistry by Annual Reviews. Reproducida con permiso de Annual Reviews en formato de republicación en un libro mediante copyright; *b*) de Jerome B Rattner y Stephanie G Phillips. *J Cell Biol* 1973;57:363, fig. 4. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press; *c*) cortesía de Jason Stumpff; *d*) cortesía de Thea Goepfert y WR Brinkley, Baylor College of Medicine, Houston, Tx.

de centríolos padre e hijo. Es normal que el inicio de la duplicación del centrosoma en la transición G1-S se desencadene por la fosforilación de una proteína centrosómica por la Cdk2, el mismo agente responsable del inicio de la replicación del DNA (figura 14-8). La duplicación del centrosoma es un proceso controlado estrictamente para que cada centríolo madre produzca solo un centríolo hijo durante cada ciclo celular. La formación de centríolos adicionales puede conducir a una división celular anormal, y puede contribuir al desarrollo del cáncer (figura 14-17*c*).

La primera etapa en la formación del huso mitótico en una célula animal típica es la aparición de microtúbulos en una disposición astral de "estallido" o **áster** alrededor de cada centrosoma, durante la fase temprana de la profase (**FIGURA 14-18**). Como se discutió en el capítulo 9, los microtúbulos crecen por adición de subunidades a sus extremos (+), mientras que sus extremos (–) permanecen asociados con el material pericentriolar (PCM, *pericentriolar material*) del centrosoma (p. 321). Se piensa que la fosforilación de las proteínas del PCM por la cinasa de tipo Polo desempeña un papel clave en la estimulación de la nucleación de los microtúbulos del huso durante la profase. El proceso de formación del áster es seguido por la separación de los centrosomas entre sí, y su posterior movimiento alrededor del núcleo hacia los extremos opuestos de la célula. La separación del centrosoma está impulsada por proteínas motoras asociadas a los microtúbulos adyacentes. A medida que los centrosomas se separan, los microtúbulos que se extienden entre ellos aumentan en número y se alargan (figura 14-18). Eventualmente los dos centrosomas llegan a puntos opuestos entre sí, estableciendo así los dos polos de un huso *bipolar* mitótico (como en la figura 14-17*a*). Tras la mitosis un centrosoma se distribuye a cada célula hija.

Varios tipos diferentes de células animales (incluidas las del embrión temprano de ratón) carecen de centrosomas, así como las células de las plantas superiores; sin embargo, todas estas células construyen un huso mitótico bipolar y realizan una mitosis relativamente típica. Husos mitóticos funcionales pueden incluso formarse en células mutantes de *Drosophila* que carecen de cen-

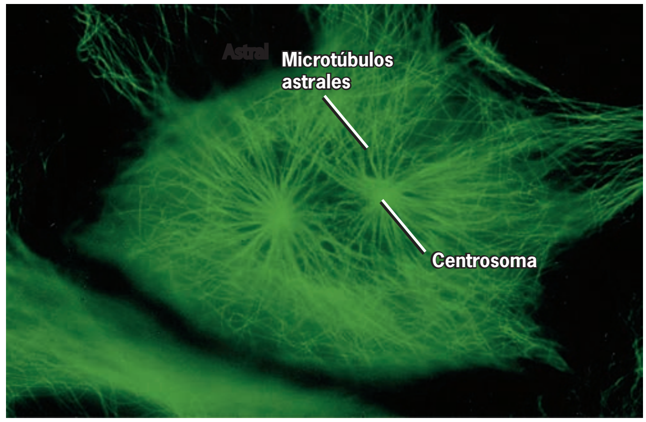



**FIGURA 14-18 Formación del huso mitótico.** Durante la profase, a medida que los cromosomas comienzan a condensarse, los centrosomas se separan unos de otros mientras organizan los haces de microtúbulos que forman el huso mitótico. Esta micrografía muestra una célula pulmonar de tritón cultivada en la profase temprana que se ha teñido con anticuerpos fluorescentes contra la tubulina, que revela la distribución de los microtúbulos de la célula (verde). Se observa que los microtúbulos del huso en desarrollo se originan como ásteres de dos sitios dentro de la célula. Estos sitios corresponden a las ubicaciones de los dos centrosomas que se mueven hacia los polos opuestos en esta etapa de la profase. Los centrosomas están situados por encima del núcleo celular, que aparece como una región oscura no teñida.

FUENTE: Jennifer Waters, Richard W Cole y Conly L Rieder. *J Cell Biol* 1993;122:364, fig. 2. Reeditado con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de Conly L Rieder.

trosomas, o en células de mamíferos en las que se ha retirado experimentalmente el centrosoma. En todos esos casos los microtúbulos del huso mitótico se nuclean cerca de los cromosomas, en lugar de hacerlo en los polos donde normalmente residirían los centrosomas. Entonces, una vez que se han polimerizado, los extremos (–) de los microtúbulos se unen (es decir, se enfocan) en cada polo del huso mediante la actividad de las proteínas motoras (**FIGURA 14-19**). Este tipo de experimentos sugieren que las células poseen, en lo fundamental, dos mecanismos diferentes para lograr el mismo resultado: centrosoma-dependiente y centrosoma-independiente. Estudios recientes han indicado que ambas vías para la formación del huso operan simultáneamente en la misma célula, y que incluso las células con centrosomas funcionales nuclean una fracción significativa de sus microtúbulos de huso en los cromosomas.

## La disolución de la envoltura nuclear y la partición de los organelos citoplásmicos

En la mayoría de las células eucarióticas el huso mitótico se ensambla en el citoplasma, y los cromosomas se compactan en el nucleoplasma. La interacción entre el huso y los cromosomas se hace posible por la ruptura de la envoltura nuclear al final de la profase. Los tres componentes principales de la envoltura nuclear —los complejos de poro nuclear, la lámina nuclear y las membranas nucleares— se desmontan en procesos separados. Sin embargo, todos estos procesos se deben iniciar por la fosforilación de sustratos clave mediante cinasas mitóticas, particularmente la ciclina B-Cdk1. Los complejos de poro nuclear se desensamblan a medida que las interacciones entre el subcomplejo de nucleoporina se interrumpen y los subcomplejos se disocian en el medio circundante. La lámina nuclear se desintegra por la despolimerización de los filamentos laminares. La integridad de las membranas nucleares se rompe primero mecánicamente, a medida que se rasgan agujeros en la envoltura nuclear por las moléculas de dineína citoplásmica asociadas con la membrana externa. El destino posterior de la porción membranosa de la envoltura nuclear ha sido objeto de controversia. Según la visión clásica, las membranas nucleares se fragmentan en una población de pequeñas vesículas que se dispersan por toda la célula mitótica. Alternativamente, las membranas de la envoltura nuclear se pueden absorber en las membranas del ER.

Algunos de los organelos membranosos del citoplasma permanecen relativamente intactos a través de la mitosis; estos incluyen las mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, así como los cloroplastos de la célula vegetal. En los últimos años se ha generado un debate considerable sobre el mecanismo por el cual el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico se dividen durante la mitosis. Según un punto de vista, el contenido del complejo de Golgi se incorpora en el ER durante la profase, y deja de existir brevemente como un organelo diferenciado. Según un punto de vista alternativo, la membrana de Golgi se fragmenta para formar una población diferenciada de pequeñas vesículas que se encuentran repartidas entre las células hijas. Un tercer punto de vista, basado en lo esencial en estudios en algas y protistas, considera todo el complejo de Golgi dividido en dos partes, y cada célula hija recibe la mitad de la estructura original. En última instancia, podemos aprender que los diferentes tipos de organismos de células utilizan distintos mecanismos de herencia de Golgi. Nuestras ideas sobre el destino del ER también han cambiado. Estudios recientes en células de mamíferos cultivadas, vivas, sugieren que la red ER permanece relativamente intacta durante la mitosis. Este punto de vista desafía los primeros estudios, realizados mayormente sobre huevos y embriones, que sugirieron que el ER experimenta una extensa fragmentación durante la profase.

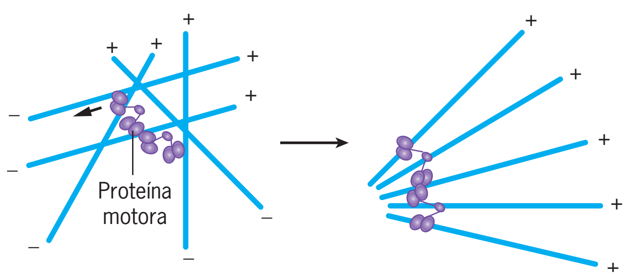



**FIGURA 14-19 Formación de un polo de huso en ausencia de centrosomas.** En este modelo cada proteína motora tiene múltiples cabezas, que están unidas a diferentes microtúbulos. El movimiento de estas proteínas motoras provoca que los extremos menos de los microtúbulos converjan para formar un polo diferenciado del huso. Se cree que este tipo de mecanismo facilita la formación de polos de huso en ausencia de centrosomas, pero también puede desempeñar un papel cuando los centrosomas están presentes.

FUENTE: AA Hyman y E Karsenti. *Cell* 1996;84:406; con permiso de Cell Press. *Cell* by Cell Press. Reproducida con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto vía Copyright Clearance Center.

**REPASO**

1. ¿De qué forma los eventos de la profase mitótica preparan las cromátidas para una separación posterior en la anafase?
2. ¿Cuáles son algunas de las actividades del cinetocoro durante la mitosis?

## 14.8 Prometafase

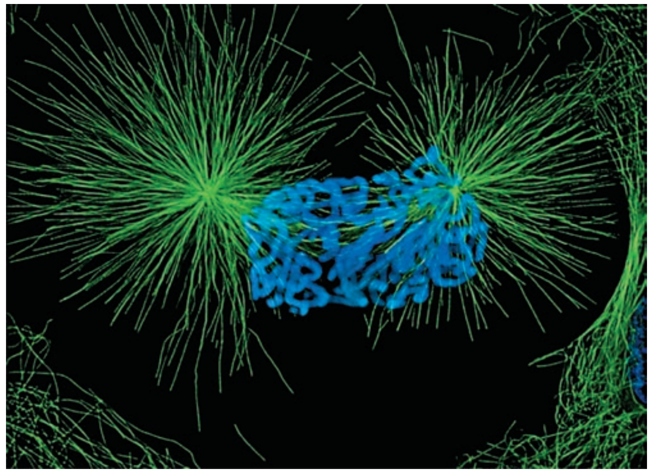
La disolución de la envoltura nuclear marca el inicio de la segunda fase de la mitosis, la **prometafase**, durante la cual se completa el ensamblaje del huso mitótico, y los cromosomas se mueven a su posición en el centro de la célula. La siguiente discusión proporciona una imagen generalizada de los pasos de la prometafase; se han reportado muchas variaciones en estos eventos.

Al comienzo de la prometafase los cromosomas compactados se dispersan por el espacio que era la región nuclear (**FIGURA 14-20*a***). A medida que los microtúbulos del huso penetran en la región central de la célula, los extremos libres (+) de los microtúbulos se ven crecer y contraerse de forma dinámica, como si estuvieran "buscando" un cromosoma. No es seguro si la búsqueda es completamente aleatoria, ya que la evidencia sugiere que los microtúbulos pueden crecer preferentemente hacia un sitio que contiene cromatina. Esos microtúbulos que entran en contacto con un cinetocoro son "capturados" y estabilizados.

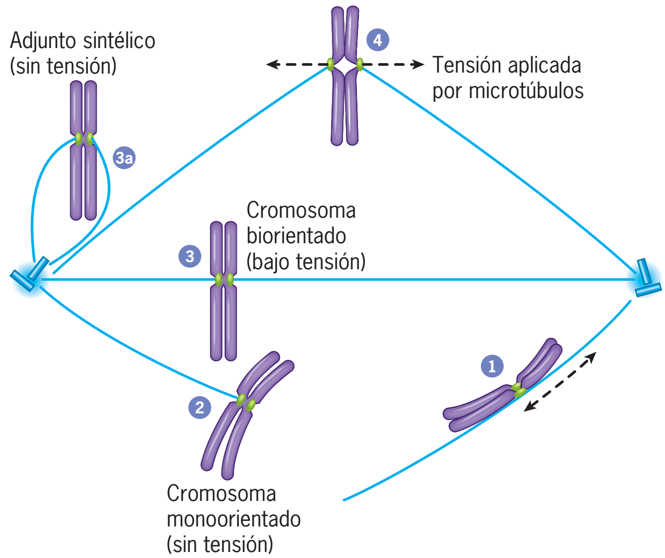
Un cinetocoro por lo general hace contacto inicial con la pared lateral de un microtúbulo en lugar de con su extremo (paso 1, figura 14-20*b*). Una vez que se produce el contacto inicial, algunos cromosomas se mueven activamente a lo largo de la pared del microtúbulo, impulsados por proteínas motoras ubicadas en el cinetocoro. Sin embargo, pronto el cinetocoro tiende a asociarse de manera estable con el extremo (+) de uno o más microtúbulos del huso de uno de sus polos (paso 2). Un cromosoma que se une a los microtúbulos de un solo polo del huso representa una etapa intermedia inestable en el curso de la prometafase. Eventualmente, el cinetocoro sin unir en la cromátida hermana captura sus propios microtúbulos del polo opuesto del huso (paso 3).

La evidencia reciente ha demostrado que los microtúbulos también pueden ser nucleados a través de una vía basada en la cromatina. Estos microtúbulos crecen desde el cromosoma mediante la incorporación de subunidades de tubulina proximales a la cromatina, y una vez ensamblados se incorporan al huso mitótico. La nucleación de microtúbulos a partir de sus lados también se ha observado recientemente. Todos estos mecanismos contribuyen a la alta densidad de microtúbulos dentro del huso, lo que ayuda a asegurar que las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma mitótico finalmente se conecten por sus cinetocoros a los microtúbulos que se extienden desde los polos opuestos. Las observaciones en las células vivas indican que los cromosomas prometafase asociados con los microtúbulos del huso no se mueven directamente al centro del huso, sino más bien oscilan adelante y atrás tanto en la dirección polo como en la antipolo. En última instancia, los cromosomas de una célula de prometafase se mueven mediante un proceso denominado **congresión** hacia el centro del huso mitótico, a medio camino entre los polos (paso 4, figura 14-20*b*). Las fuerzas requeridas para los movimientos cromosómicos durante la prometafase son generadas por las proteínas motoras asociadas con ambos; los cinetocoros y los brazos de los cromosomas [representados en la figura 14-33*a*) y discutidos en la sección anterior]. La **FIGURA 14-21** muestra las consecuencias de una deficiencia de la proteína motora acromosómica, cuya actividad empuja al cromosoma lejos de los polos.

La dinámica de los microtúbulos también realiza un papel clave para facilitar los movimientos cromosómicos durante la prometafase. A medida que los cromosomas convergen hacia el centro del huso mitótico, se acortan los microtúbulos más largos unidos a un cinetocoro, mientras que los microtúbulos más cortos unidos al cinetocoro hermano se alargan. Se cree que estos cambios en la longitud de los microtúbulos se rigen por diferencias en la fuerza de tracción (tensión) en los dos cinetocoros hermanos.



*a*)




*b*)

**FIGURA 14-20 Prometafase** *a*) Microfotografía de fluorescencia de una célula cultivada de pulmón del anfibio newt en la etapa de prometafase temprana de la mitosis, justo después de que se ha roto la envoltura nuclear. Los microtúbulos del huso mitótico ahora pueden interactuar con los cromosomas. El huso mitótico aparece en verde después del marcaje con un anticuerpo monoclonal contra la tubulina, mientras que los cromosomas aparecen en azul después del marcaje con un tinte fluorescente. *b*) Vista esquemática de algunas de las etapas sucesivas de las interacciones entre microtúbulos de los cromosomas durante la prometafase. En el paso 1, un cinetocoro ha hecho contacto con la pared lateral de un microtúbulo y es capaz de utilizar motores unidos a cinetocoros para deslizarse en cualquier dirección a lo largo del microtúbulo. En el paso 2, un cromosoma se ha unido al extremo + de un microtúbulo de un polo del huso (una adición sobrefinal que forma un cromosoma monoorientado). En el paso 3, el cromosoma se ha adjuntado en una orientación sobrefinal de los microtúbulos de ambos polos (formando un cromosoma bioorientado). En el paso 4, el cromosoma biorientado se ha movido al centro de la célula y se convertirá en parte de la placa metafásica. Los cromosomas en esta etapa están bajo tensión (como lo indica el espacio entre las cromátidas) debido a las fuerzas de tracción contrarias, ejercidas por los microtúbulos de los polos opuestos. El cromosoma en el paso 3a tiene ambos cinetocoros unidos a microtúbulos del mismo polo del huso. Esta conexión sintélica anormal se trata en la página 566.

FUENTE: *a*) Cortesía de Alexey Khodjakov, Wadsworth Center, NY.

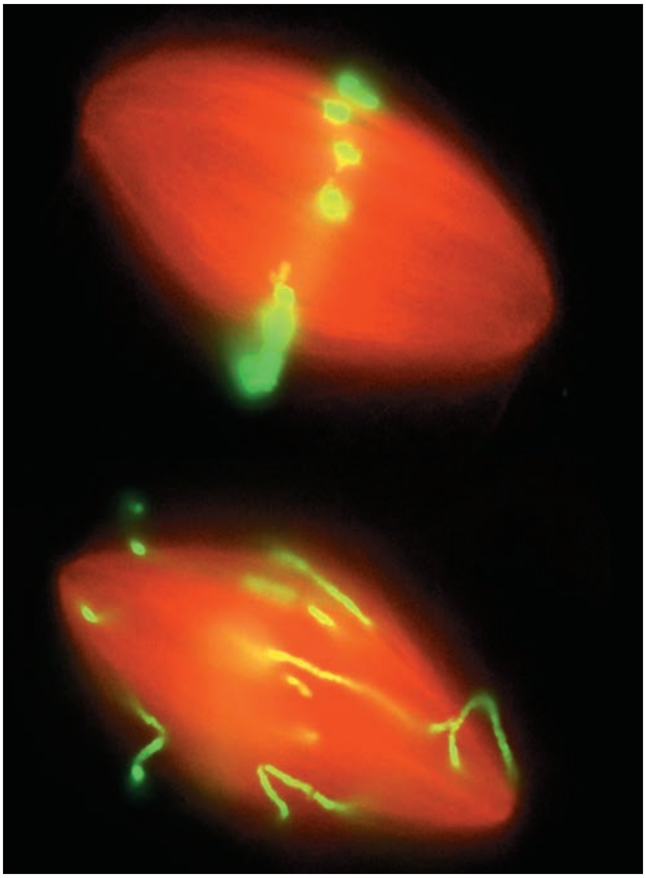


**FIGURA 14-21 La consecuencia de la falta de una proteína motora en la alineación del cromosoma durante la prometafase.** La micrografía superior muestra un huso mitótico que se ha ensamblado en un extracto completo de huevo de rana. La micrografía inferior muestra un huso mitótico que se ha ensamblado en un extracto de huevo de rana que se ha agotado de una proteína relacionada con una cinesina particular llamada Kid, que está presente a lo largo de los brazos de los cromosomas de la prometafase. En ausencia de esta proteína motora, los cromosomas fracasan en alinearse en el centro del huso, y en su lugar se encuentran estirados a lo largo de los microtúbulos y agrupados cerca de los polos. Normalmente la Kid proporciona la fuerza para alejar a los cromosomas de los polos (véase figura 14-33*a*).

FUENTE: Celia Antonio, *et al. Cell* 2000;4(102), portada; con permiso de Elsevier. Cortesía de Isabelle Vernos.

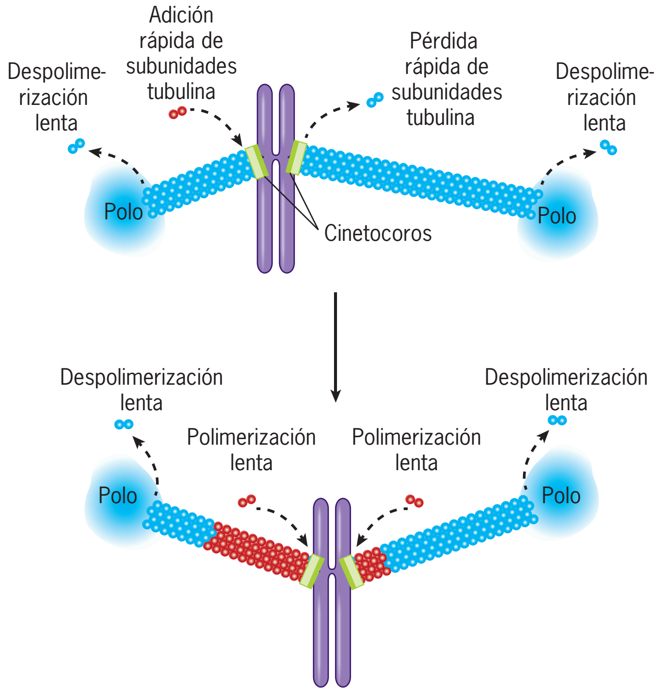



**FIGURA 14-22 Comportamiento de los microtúbulos durante la formación de la placa metafásica.** Al inicio el cromosoma está conectado a microtúbulos de polos opuestos, que pueden ser muy diferentes en longitud. A medida que continúa la prometafase, este desequilibrio se corrige como resultado del acortamiento de los microtúbulos de un polo, debido a la pérdida rápida de subunidades de tubulina en el cinetocoro, y al alargamiento de los microtúbulos del polo opuesto a causa de la rápida adición de subunidades de tubulina en el cinetocoro. Estos cambios se superponen sobre una polimerización y una despolimerización mucho más lentas, aparentes en el dibujo inferior, que ocurren continuamente durante la prometafase y la metafase, lo que hace que las subunidades del microtúbulo se muevan hacia los polos en un proceso conocido como flujo de microtúbulos.

El acortamiento y alargamiento de los microtúbulos se produce, en lo esencial, por la pérdida o ganancia de las subunidades en el extremo (+) del microtúbulo (**FIGURA 14-22**). Es de destacar que esta actividad dinámica ocurre mientras que el extremo (+) de cada microtúbulo permanece unido a un cinetocoro.

Eventualmente cada cromosoma se mueve en una posición a lo largo de un plano en el centro del huso, de modo que los microtúbulos de cada polo son equivalentes en longitud. El movimiento de un cromosoma errático, desde un sitio periférico cerca de uno de los polos al centro del huso mitótico durante la prometafase, se muestra en la serie de fotos en la **FIGURA 14-23**.

## REPASO

1. Describa el movimiento de los cromosomas durante la prometafase. ¿Qué fuerzas causan este movimiento?

## 14.9 Metafase

Una vez que todos los cromosomas se alinean en el ecuador del huso —con una cromátida de cada cromosoma conectada por su cinetocoro a los microtúbulos de un polo, y su cromátida hermana conectada por su cinetocoro a los microtúbulos del polo opuesto— la célula ha alcanzado la **metafase** (**FIGURA 14-24**). El plano de alineación de los cromosomas en la metafase se denomina *placa metafásica.* El huso mitótico de la célula en metafase contiene una matriz altamente organizada de microtúbulos, ideal para la tarea de separar las cromátidas duplicadas situadas en el centro de la célula. De forma funcional y espacial, los microtúbulos del eje metafásico de una célula animal se pueden dividir en tres grupos (figura 14-24):

1. *Microtúbulos astrales*, que se irradian hacia afuera desde el centrosoma hacia la región fuera del cuerpo del huso. Ayudan a ubicar el aparato de huso en la célula y pueden ayudar a determinar el plano de la citocinesis.
2. *Microtúbulos cromosómicos* (del *cinetocoro*) que se extienden entre el centrosoma y los cinetocoros de los cromosomas. En las células de mamíferos, cada cinetocoro está unido a un haz de 20-30 microtúbulos que forma una *fibra* de huso (o *fibra k*). Durante la metafase, los microtúbulos cromosómicos ejercen una fuerza de tracción sobre los cinetocoros. Como resultado,

los cromosomas se mantienen en el plano ecuatorial mediante una contienda entre las fuerzas de tracción ejercidas por las fibras del huso cromosómico desde los polos opuestos. Estas fuerzas de tracción generan deformaciones dentro del cinetocoro, y causan oscilaciones de los cromosomas situados en la placa metafásica. Durante la anafase se requieren los microtúbulos cromosómicos para el movimiento de los cromosomas hacia los polos.

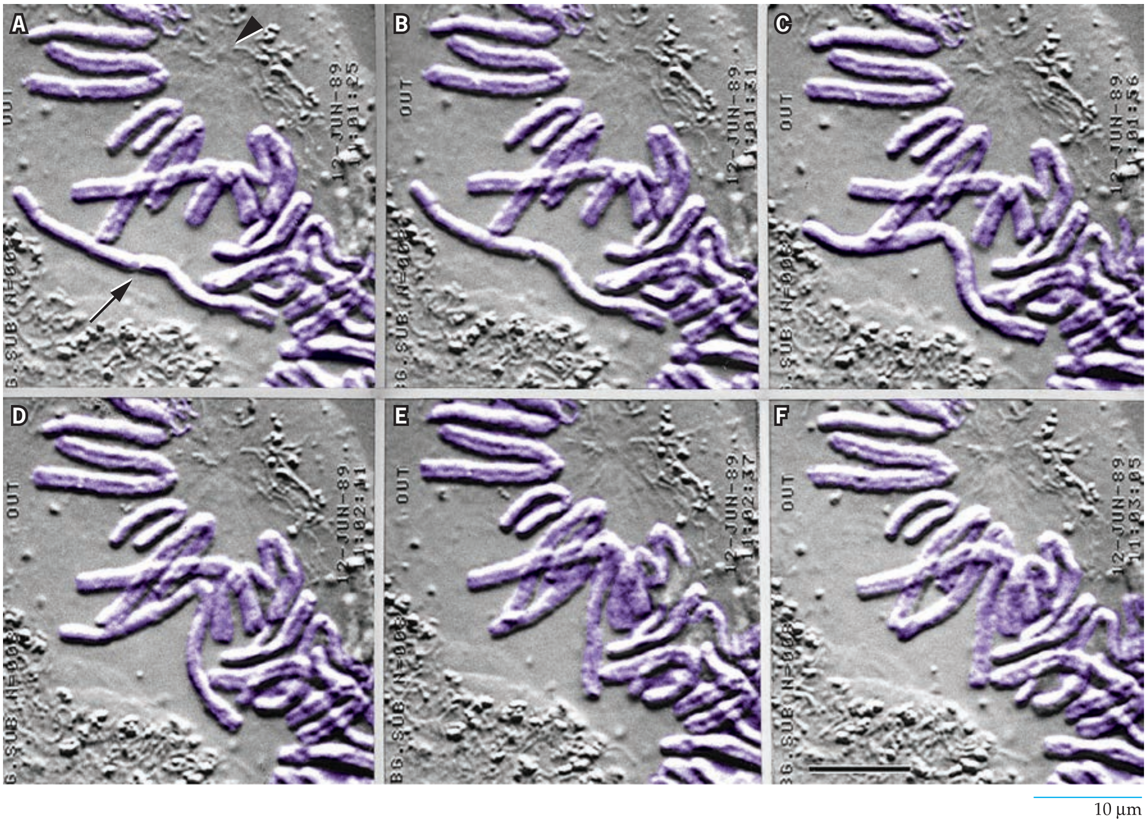



**FIGURA 14-23 La contienda de un cromosoma durante la prometafase y su movimiento hacia la placa metafásica.** Esta serie de fotografías tomadas de una grabación de video muestra los movimientos de los cromosomas de una célula pulmonar newt por un periodo de 100 segundos durante la prometafase. Aunque la mayoría de los cromosomas de la célula estaban casi alineados en la placa metafásica al comienzo de la secuencia, uno de los cromosomas (flecha) había fracasado en unirse a las fibras del huso de ambos polos. El cromosoma indeciso se ha unido a las fibras del huso de los polos opuestos en B, y luego se mueve hacia el ecuador del huso con velocidad variable, hasta que alcanza una posición estable en F. La posición de un polo está indicada por la punta de flecha en A.

FUENTE: Stephen P Alexander y Conly L Rieder. *J Cell Biol* 1991;113:807, fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de Conly L Rieder.

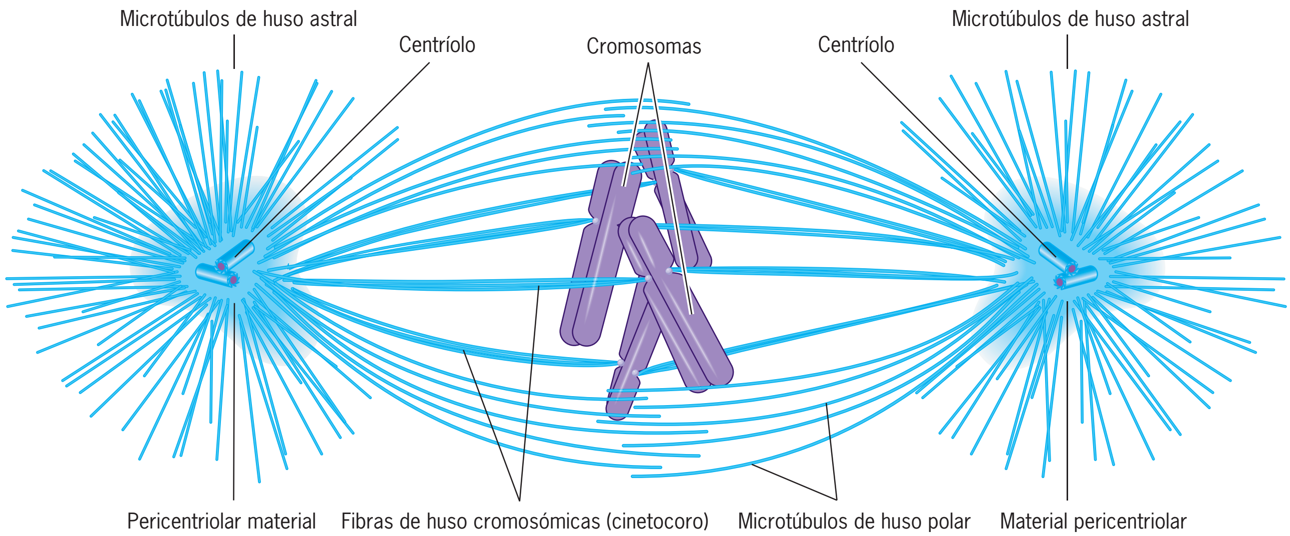



**FIGURA 14-24 El huso mitótico de una célula animal.** Cada polo del huso contiene un par de centríolos, rodeados por material amorfo pericentriolar, donde los microtúbulos están nucleados. Son evidentes tres tipos de microtúbulos de huso —microtúbulos de huso astrales, cromosómicos y polares— y sus funciones se describen en el texto. Todos los microtúbulos del huso, que pueden ser miles, tienen sus extremos (–) apuntando hacia el centrosoma. Aunque no se muestra aquí, los husos también pueden contener microtúbulos más cortos que no hacen contacto con un cinetocoro o con un polo de huso.

3. *Microtúbulos polares (o interpolares)* que se extienden desde el centrosoma más allá de los cromosomas. Los microtúbulos polares de un centrosoma se superponen con sus contrapartes del centro opuesto. Los microtúbulos polares forman un cesto estructural que mantiene la integridad mecánica del huso.



Cuando uno observa con atención películas o videos de la mitosis, la metafase aparece como una etapa durante la cual la célula hace una pausa durante un breve tiempo, como si todas las actividades mitóticas se detuvieran repentinamente. Sin embargo, el análisis experimental revela que la metafase es un periodo donde ocurren eventos importantes.

Aunque no hay un cambio obvio en la longitud de los microtúbulos cromosómicos mientras los cromosomas se alinean en la placa metafásica, los estudios que usan tubulina marcada por fluorescencia indican que los microtúbulos existen en un estado altamente dinámico (véase **video de asesoría experimental de este capítulo: "Microscopía fluorescente de las células vivas para aprender más sobre la microscopía fluorescente"**). Las subunidades se pierden rápidamente y se añaden a los extremos positivos de los microtúbulos cromosómicos, aunque estos extremos están unidos al cinetocoro. Por tanto, el cinetocoro no actúa como una tapa al final de los microtúbulos, bloqueando la entrada o salida de las subunidades terminales, sino que es el sitio de actividad dinámica. Debido a que se agregan más subunidades al extremo positivo que las que se pierden, hay una adición neta de subunidades al cinetocoro. Mientras tanto, los extremos negativos de los microtúbulos experimentan una pérdida de energía, y así las subunidades se mueven a lo largo de los microtúbulos cromosómicos desde el cinetocoro hacia el polo. Este *flujo hacia el polo* de las subunidades de tubulina en un huso mitótico está indicado en el experimento ilustrado en la **FIGURA 14-25**. La pérdida de las subunidades de tubulina en los polos probablemente se debe a un miembro de la familia de proteínas motoras cinesina-13, cuya función es promover la despolimerización de los microtúbulos en vez del movimiento (p. 317).

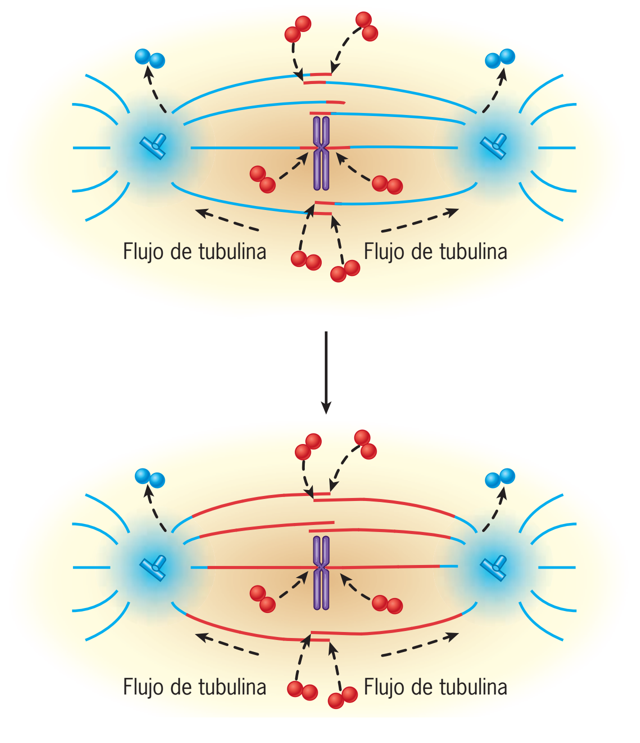



**FIGURA 14-25 Flujo de tubulina a través de los microtúbulos del huso mitótico en la metafase.** Aunque los microtúbulos aparecen estacionarios en esta etapa, la inyección de subunidades de tubulina marcadas con fluorescencia indica que los componentes del huso están en un estado dinámico de flujo. Las subunidades se incorporan preferentemente en los cinetocoros de los microtúbulos cromosómicos y en los extremos ecuatoriales de los microtúbulos polares, y se pierden preferentemente desde los extremos negativos de los microtúbulos en la región de los polos. Las subunidades de tubulina se mueven a través de los microtúbulos del huso metafásico a una velocidad de aproximadamente 1 μm/min.

**REPASO**

1. Describa el desempeño de los microtúbulos astrales, cinetocoros y polares en el huso mitótico.

## 14.10 Anafase

La **anafase** comienza cuando las cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan y comienzan su movimiento hacia los polos opuestos.

### El papel de la proteólisis en la progresión a través de la mitosis

Hemos visto lo importante que resulta que las actividades específicas tengan lugar en su orden apropiado durante todo el ciclo celular. Este ordenamiento depende en gran medida de la destrucción selectiva de las proteínas reguladoras del ciclo celular en instantes precisos del ciclo. Antes se señaló que dos complejos multiproteicos distintos, el SCF y el APC, agregan ubiquitina a proteínas en diferentes etapas del ciclo celular, haciéndolas un objetivo para la destrucción por un proteosoma. Los periodos durante el ciclo celular en los que los complejos SCF y APC están activos se muestran en la **FIGURA 14-26*a***. Como se ilustra en la figura, el SCF actúa principalmente durante la interfase. Por el contrario, el *complejo promotor de anafase*, o *APC (anaphase promoting complex)*, desempeña un papel clave en la regulación de los eventos que ocurren durante la mitosis. El APC contiene cerca de una docena de subunidades centrales, además de una "proteína adaptadora" que desempeña un papel clave en la determinación de cuáles proteínas sirven como sustrato del APC. Dos versiones alternativas de esta proteína adaptadora —Cdc20 y Cdh1— determinan la selección del sustrato durante la mitosis. Los complejos APC que contienen uno u otro de estos adaptadores se conocen como $APCC^{dc20}$ y $APCC^{dh1}$ (figura 14-26*a*).

El $APCC^{dc20}$ se activa antes de la metafase (figura 14-26*a*) y ubiquitina, un inhibidor clave de la anafase llamado *securina*, denominado así porque asegura la unión entre las cromátidas hermanas. La ubiquitinación y destrucción de la securina al final de la metafase libera una proteasa activa llamada *separasa*. Entonces la separasa divide la subunidad Scc1 de la molécula de cohesina que mantiene juntas las cromátidas hermanas (figura 14-26*b*). La división de la cohesina activa la separación de las cromátidas hermanas para marcar el inicio de la anafase. El apoyo experimental para el papel de la cohesina en el mantenimiento de la unión de cromátidas hermanas proviene de estudios en los que se han inyectado enzimas proteolíticas en células que se habían detenido en la metafase. La división de la cohesina por tales enzimas conduce rápidamente a la separación de cromátidas, y a su movimiento tipo anafase hacia los polos.

Casi al final de la mitosis, la Cdc20 está inactiva y el adaptador alterno Cdh1 toma el control de la selección del sustrato del APC (figura 14-26*a*). Cuando el Cdh1 se asocia con el APC, la enzima finaliza la ubiquitinación de la ciclina B que se inició con el $APCC^{dc20}$. La destrucción de la ciclina conduce a una caída precipitada de la actividad de la Cdk mitótica (ciclina B-Cdk1) y a la progresión de la célula fuera de la mitosis a la fase $G_1$ del siguiente ciclo celular. La importancia de la degradación de proteínas en la regulación de los eventos de mitosis y la reentrada de

células en el $G_1$ se revela mejor con el uso de inhibidores (**FIGURA 14-27**). Si se previene la destrucción de la ciclina B con un inhibidor del proteosoma, las células permanecen detenidas en una etapa tardía de la mitosis. Si dichas células que se detienen en la mitosis se tratan posteriormente con un compuesto que inhibe la actividad cinasa de la Cdk1, la célula volverá a sus actividades normales y continuará a través de la mitosis y la citocinesis. La finalización de la mitosis requiere claramente el cese de la actividad de la Cdk1 (ya sea por la destrucción normal de su activador de ciclina o por inhibición experimental). Quizás el hallazgo más sorprendente de todos se obtiene cuando las células inhibidas por proteosomas e inhibidas por Cdk1, que ya han salido de

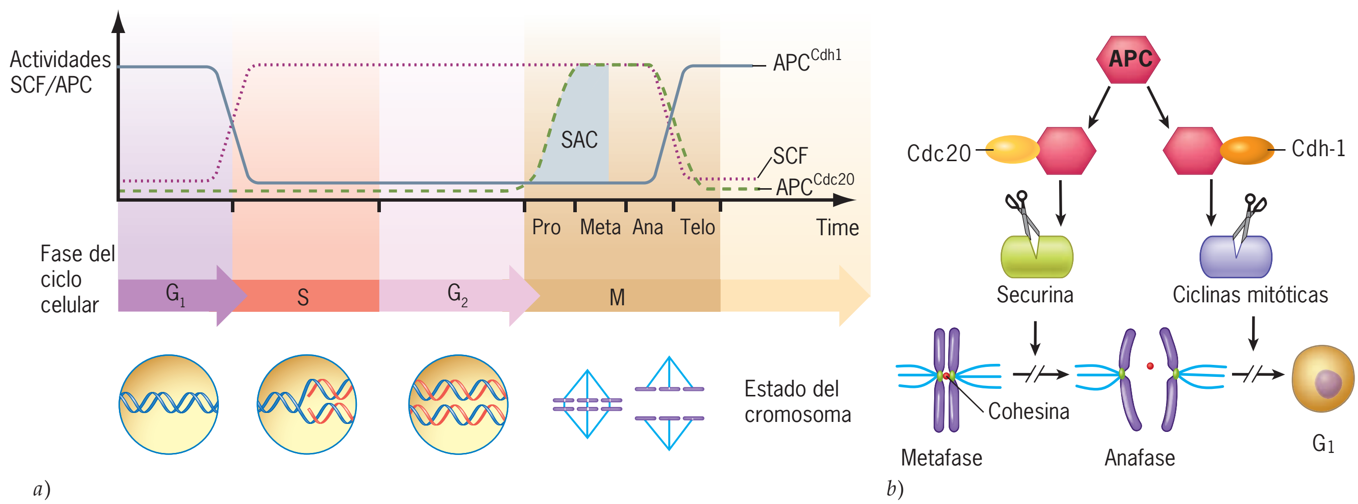



**FIGURA 14-26** Actividades del SCF y APC durante el ciclo celular. El SCF y el APC son complejos multisubunidad que ubiquitinan sustratos, lo que lleva a su destrucción por proteosomas. *a*) El SCF es activo principalmente durante la interfase, mientras que el APC (complejo promotor de anafase) está activo durante la mitosis y el $G_1$. Se indican dos versiones diferentes del APC. Estos dos APC difieren en que contienen una proteína adaptadora Cdc20 o Cdh1, que altera los sustratos reconocidos por la APC. El $APC^{Cdc20}$ está activo temprano en la mitosis, en un momento en que la Cdh1 se inhibe por la fosforilación mediada por la Cdk1. Cuando la actividad de la Cdk1 cae bruscamente en la mitosis, se activa la Cdh1, lo que lleva a la activación del $APC^{Cdh1}$. La etiqueta SAC significa punto de control del conjunto del huso, que se trata en la página 566. El SAC evita que $APC^{Cdc20}$ active la anafase hasta que todos los cromosomas estén alineados correctamente en la placa metafásica. *b*) El $APC^{Cdc20}$ es responsable de la destrucción de proteínas como la securina, que inhiben la anafase. La destrucción de estos sustratos promueve la transición metafase-anafase. La $APC^{Cdh1}$ es responsable de unir con ubiquitina proteínas, como las ciclinas mitóticas, que inhiben la salida de la mitosis. La destrucción de estos sustratos promueve la transición mitosis-$G_1$. La actividad del $APC^{Cdh1}$ durante el $G_1$ temprano ayuda a mantener la baja actividad de la ciclina-Cdk (figura 14-8) requerida para ensamblar los complejos de prerreplicación en los orígenes de la replicación (figura 13-20). (Aunque no se discute aquí, la activación de fosfatasas que eliminan los grupos fosfato agregados por la Cdk1 también desempeña un papel importante en la conducción de los eventos que ocurren durante las últimas etapas de la mitosis y la reinserción en $G_1$; véase *Nature Revs Mol Cell Biol* 2011;12:469).

FUENTE: *a*) J-M Peters. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:762; Copyright 1998. Current Opinion in Cell Biology de Elsevier Ltd. Reproducida con permiso de Elsevier Ltd en el formato de reutilización en un libro/libro de texto vía Copyright Clearance Center. Véase también *Nature Revs Mol Cell Biol* 2006;7:650.

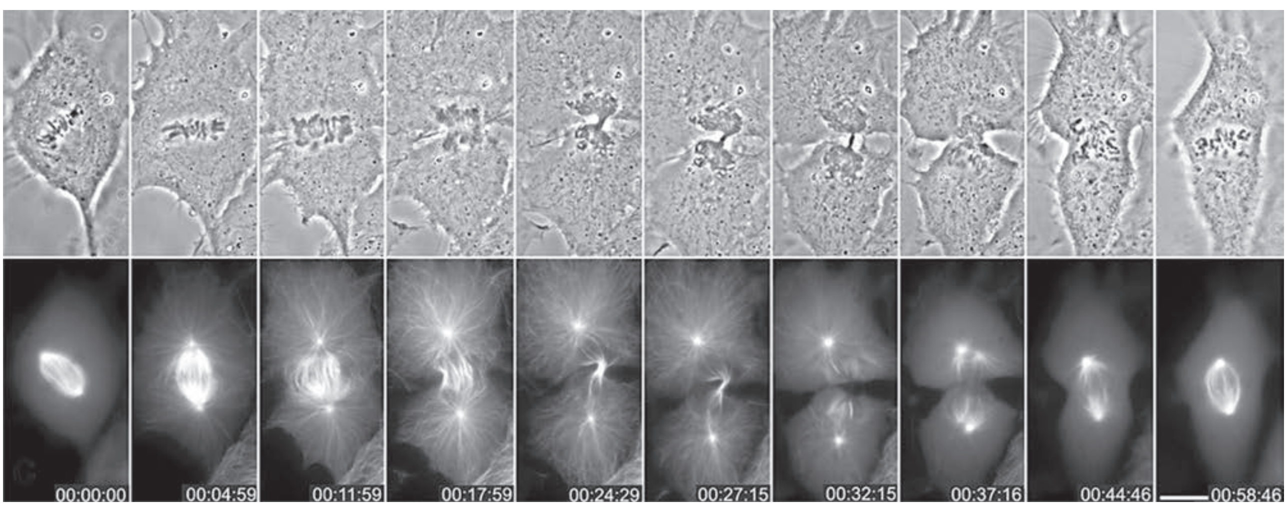



**FIGURA 14-27 Demostración experimental de la importancia de la proteólisis en la salida irreversible de una célula de la mitosis.** Esta ilustración muestra cuadros del video de una célula que había sido detenida en mitosis por la presencia de un inhibidor del proteosoma (MG132). En el momento 0 un inhibidor de Cdk1 (flavopiridol) se añadió al medio, lo que provocó que la célula completara la mitosis e iniciara la citocinesis. A los 25 minutos, la célula se lavó libre del inhibidor de Cdk1. Debido a que la célula todavía contenía ciclina B (que normalmente habría sido destruida por los proteosomas), la célula volvió a entrar en la mitosis y progresó a la metafase observada en los últimos cinco cuadros del video. La fila superior muestra imágenes de contraste de fase de la célula en varios instantes, y la fila inferior muestra las correspondientes micrografías de fluorescencia con los tiempos indicados. El video 3, del cual se tomaron estos fotogramas, se puede ver aquí: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1513549/bin/NIHMS10478-supplement-Video003.mov. La barra en la imagen inferior derecha es igual a 10 µm.

FUENTE: Tamara A Potapova, *et al*. *Nature* 2006;440:954 © 2006. Reimpresa con permiso de Macmillan Publishers Limited. Cortesía de Gary J Gorbsky.

la mitosis, se lavan libres del inhibidor de Cdk1 (figura 14-27). Tales células, que ahora contienen tanto ciclina B como Cdk1 activo, en realidad progresan en la dirección inversa y regresan hacia la mitosis. Esta inversión se caracteriza por la compactación de los cromosomas, la rotura de la envoltura nuclear, el ensamblaje de un huso mitótico y el movimiento de los cromosomas de vuelta a la placa metafásica, como se muestra en la figura 14-27. Todos estos eventos se desencadenan por la reactivación inapropiada de la actividad de la Cdk1 mediante la eliminación de su inhibidor. Esta búsqueda ilustra de forma espectacular la importancia de la proteólisis para mover el ciclo celular normal en una dirección única e irreversible.

## Los eventos de la anafase

Todos los cromosomas de la placa metafásica se dividen en sincronía al inicio de la anafase, y las cromátidas (ahora denominadas cromosomas porque ya no están unidas a sus hermanas) inician su migración hacia los polos (véase figura 14-11). Como cada cromosoma se mueve durante la anafase, su centrómero se ve en su borde de ataque con los brazos del cromosoma detrás (**FIGURA 14-28*a***). El movimiento de los cromosomas hacia los polos opuestos es muy lento en comparación con otros tipos de movimientos celulares, aproximadamente 1 μm por minuto, un valor calculado en una investigación de mitosis que equivale a un viaje desde Carolina del Norte a Italia que demoraría casi 14 millones de años. La baja velocidad del movimiento cromosómico asegura que los cromosomas se segreguen con precisión y sin enredarse. Las fuerzas que se cree que potencian el movimiento cromosómico durante la anafase se discuten en la siguiente sección.

El movimiento hacia los polos de los cromosomas se acompaña de un acortamiento obvio de los microtúbulos cromosómicos. Se ha apreciado durante mucho tiempo que las subunidades de tubulina se pierden a partir de los extremos (+) (basados en cinetocoros) de los microtúbulos cromosómicos durante la anafase (figura 14-28*b*). Las subunidades también se pierden de los extremos (–) de estos microtúbulos, como resultado del continuo flujo hacia el polo de las subunidades de tubulina que se producen durante la prometafase y metafase (figuras 14-22 y 14-25). La principal diferencia en la dinámica de los microtúbulos entre la metafase y la anafase es que las subunidades se agregan a los extremos (+) de los microtúbulos durante la metafase, manteniendo constante la longitud de las fibras cromosómicas (figura 14-25), mientras que las subunidades se pierden de los extremos (–) durante la anafase, lo que produce un acortamiento de las fibras cromosómicas (figura 14-28*b*). Se cree que este cambio en el comportamiento en los extremos (+) de los microtúbulos se desencadena por la pérdida de tensión sobre los cinetocoros tras la separación de las cromátidas hermanas.

El movimiento de los cromosomas hacia los polos se conoce como **anafase A**, para distinguirlo de un movimiento separado —pero simultáneo— llamado **anafase B**, en el que los dos polos del huso se separan más. El alargamiento del huso mitótico durante la anafase B se acompaña de la adición neta de subunidades de tubulina a los extremos (+) de los microtúbulos polares. Por tanto, las subunidades se pueden agregar con preferencia a los microtúbulos polares, y eliminarse de los microtúbulos cromosómicos al mismo tiempo, en diferentes regiones del mismo eje mitótico (figura 14-28*b*).

## Fuerzas requeridas para los movimientos de los cromosomas en la anafase

A principios de la década de 1960 Shinya Inoué, del Laboratorio de Biología Marina en Woods Hole, propuso que la despolimerización de los microtúbulos cromosómicos durante la anafase no era una simple consecuencia del movimiento cromosómico, sino la causa de ello. Inoué sugirió que la despolimerización de los micro-



*a*)

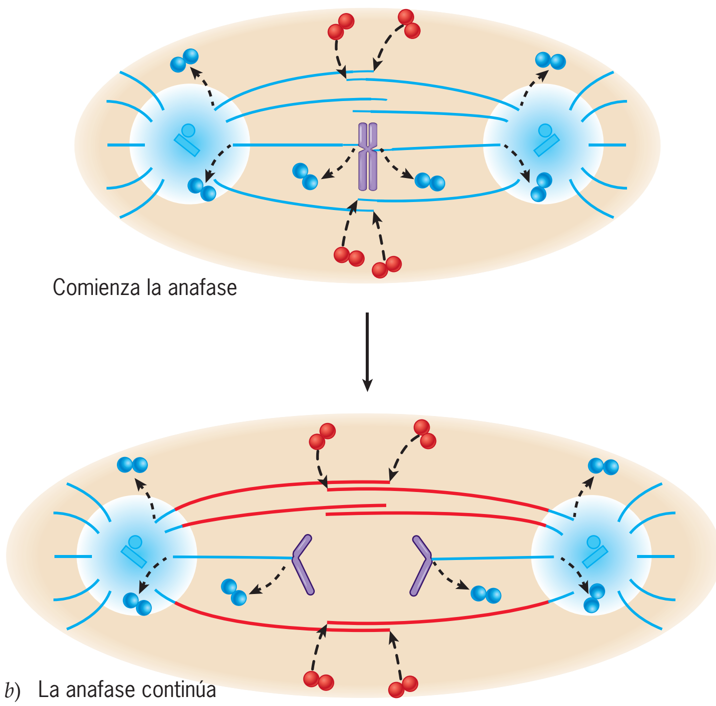



**FIGURA 14-28 El huso mitótico y los cromosomas en la anafase**. *a*) Microfotografía de fluorescencia de una célula en anafase tardía, que muestra los brazos altamente compactados de los cromosomas en esta etapa. Se ve que los brazos se arrastran detrás, mientras los cinetocoros guían el camino hacia los polos respectivos. Las fibras del huso cromosómico en esta etapa de anafase tardía son extremadamente cortas, y son menos evidentes entre los bordes anteriores de los cromosomas y los polos. Los microtúbulos del huso polar son visibles en la interzona entre los cromosomas separadores. Se cree que los movimientos relativos de los microtúbulos polares son responsables de causar la separación de los polos que ocurren durante la anafase B. *b*) La dinámica de los microtúbulos durante la anafase. Las subunidades de tubulina se pierden desde ambos extremos de los microtúbulos cromosómicos, lo que produce un acortamiento de las fibras cromosómicas y el movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase A. Mientras tanto, las subunidades de tubulina se agregan a los extremos de los microtúbulos polares, que también se deslizan uno sobre otro, lo que conduce a la separación de los polos durante la anafase B.

FUENTE: *a*) Nasser Rusan, UNC Chapel Hill, 2005 Olympus Bioscapes Competition.

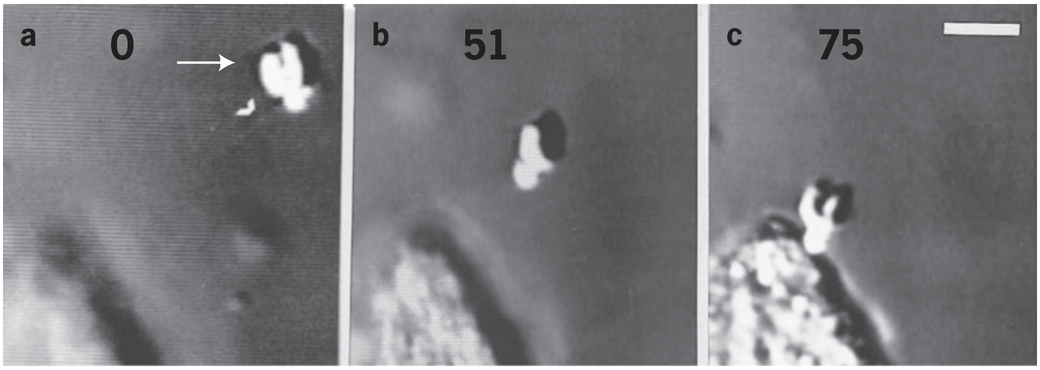



**FIGURA 14-29 Demostración experimental de que la despolimerización de microtúbulos puede mover los cromosomas unidos *in vitro*.** La estructura en la parte inferior izquierda es el remanente de un protozoo lisado. En presencia de tubulina, los cuerpos basales en la superficie del protozoo se usaron como sitios para el inicio de los microtúbulos, que crecían hacia afuera en el medio. Una vez que se formaron los microtúbulos, se introdujeron cromosomas mitóticos condensados en la cámara, y se les permitió unirse a los extremos de los microtúbulos. La flecha muestra un cromosoma unido al extremo de un haz de microtúbulos. La concentración de tubulina soluble dentro de la cámara se disminuyó por dilución, lo que provocó la despolimerización de los microtúbulos. Como se muestra en esta secuencia de video, la contracción de los microtúbulos fue acompañada por el movimiento del cromosoma adjunto. La barra es igual a 5 μm.

FUENTE: Martine Coue, Vivian A Lombillo, y J Richard Mcintosh. *J Cell* Biol 1991;112:1169, fig. 3. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

túbulos que comprende una fibra de huso podría generar suficiente fuerza mecánica para tirar de un cromosoma hacia adelante.

El primer soporte experimental para el modelo de la fuerza de desensamblaje provino de estudios donde los cromosomas experimentaron un movimiento considerable como resultado de la despolimerización de los microtúbulos adheridos. Un ejemplo de uno de estos experimentos se muestra en la **FIGURA 14-29**. En este caso, el movimiento de un cromosoma unido a microtúbulos (flecha) ocurre *in vitro*, después de la dilución del medio. La dilución reduce la concentración de tubulina soluble, que a su vez promueve la despolimerización de los microtúbulos. Este tipo de experimentos, así como los estudios de medición directa de la fuerza, indican que la despolimerización de microtúbulos por sí sola puede generar fuerza suficiente para atraer a los cromosomas a través de una célula.

La **FIGURA 14-30** representa un modelo de los eventos propuestos a ocurrir durante el movimiento cromosómico en la anafase en una célula de vertebrado. Como se indica en la figura 14-28*b*, los microtúbulos que comprenden las fibras del huso cromosómico experimentan durante la anafase una despolimerización en ambos extremos (+) y (–). Estas actividades combinadas guían el movimiento de los cromosomas hacia el polo. La despolimerización en los extremos de los microtúbulos (–) sirve para transportar los cromosomas hacia los polos, debido al flujo hacia los polos que recuerda a una persona que viaja en una banda sinfín o estera de aeropuerto. La despolimerización en los extremos de los microtúbulos (+) causa que el túbulo se enrolle mientras aún arrastra los cromosomas. Algunas células dependen más del flujo hacia adelante, otras dependen más de la despolimerización del extremo (+). Los estudios de células animales en la anafase han revelado que tanto el extremo (+) como el final de las fibras cromosómicas son sitios en los que se localizan las cinesinas despolimerizantes (miembros de la familia cinesina-13, p. 567). Estas despolimerasas están indicadas en los extremos

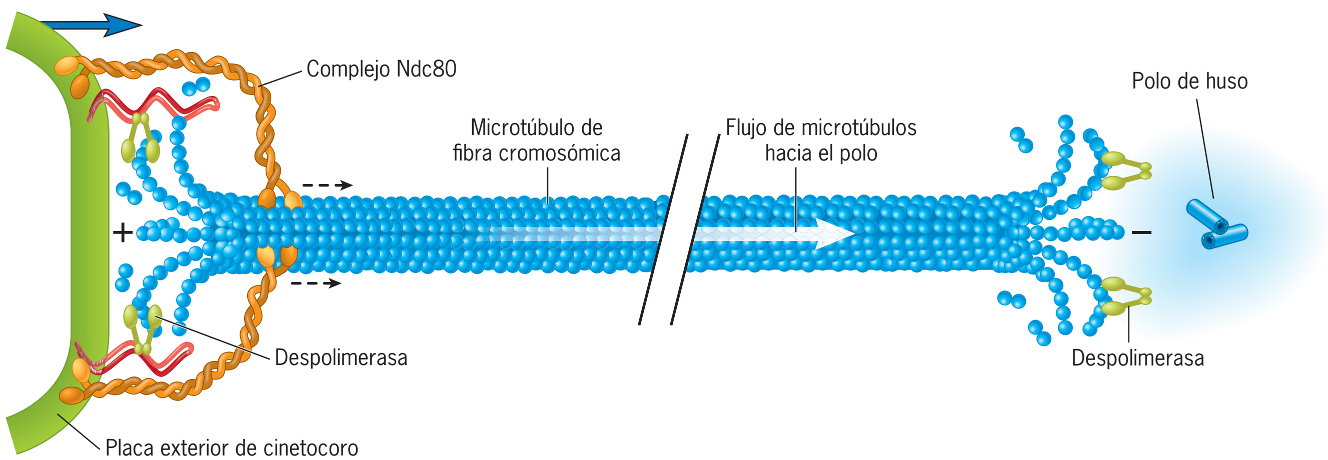



**FIGURA 14-30 Mecanismo propuesto para el movimiento de cromosomas durante la anafase en células animales.** En el modelo representado aquí el movimiento cromosómico hacia los polos se lleva a cabo mediante una combinación de flujo hacia los polos —que mueve el cuerpo de cada microtúbulo hacia uno de los polos— y la despolimerización simultánea del microtúbulo en ambos extremos. Las cinesinas despolimerizantes de la familia cinesina-13 se han localizado en los extremos (+) (cinetocoro) y – (polar) de los microtúbulos cromosómicos, y se postula que son responsables de la despolimerización en sus sitios respectivos. En este modelo el complejo de proteína Ndc80, de la placa de cinetocoro externo, actúa como el dispositivo que acopla la despolimerización de microtúbulos a la segregación cromosómica. La fuerza requerida para el movimiento del cromosoma la proporciona la liberación de energía de tensión, a medida que el microtúbulo se despolimeriza. La energía liberada es utilizada por los extremos rizados de los protofilamentos despolimerizantes para desviar el movimiento de las cabezas unidas del complejo Ndc80 (flecha negra discontinua) hacia el extremo (–) del microtúbulo. Las proteínas motoras del cinetocoro, como la dineína citoplásmica, también pueden tener un papel generador de fuerzas en el movimiento cromosómico durante la anafase.

opuestos de los microtúbulos de la figura 14-30. Si cualquiera de estas "despolimerasas" de los microtúbulos se inhibe, la segregación cromosómica durante la fase anafásica se altera, al menos parcialmente. Estos hallazgos sugieren que la despolimerización mediada por la cinesina ATP-dependiente forma la base para la segregación cromosómica durante la mitosis.

Una de las preguntas de mayor interés en el campo de la mitosis es el mecanismo mediante el cual los cinetocoros se pueden aferrar a los finales (+) de los microtúbulos que están perdiendo subunidades de tubulina. Durante la mitosis se forma un complejo molecular —conocido como la red KMN— en el cinetocoro superior de cada cromosoma. Un componente estructural clave de la red KMN es un complejo de proteínas conocido como Ndc80; los complejos Ndc80 están presentes como fibrillas moleculares que se extienden para formar enlaces relativamente débiles con un microtúbulo unido justo detrás de su extremo (+). Se estima que cada microtúbulo se pone en contacto, a su alrededor, con unas seis a nueve de estas ataduras Ndc80. Varios estudios sugieren que, como se indica en la figura 14-30, las cabezas terminales de los complejos Ndc80 pueden viajar a lo largo del microtúbulo hacia su extremo (–), empujadas por los protofilamentos rizados de la punta de desmontaje. Como resultado, el cromosoma unido se mueve hacia el polo del huso, mientras es remolcado por la fibra cromosómica que se contrae.

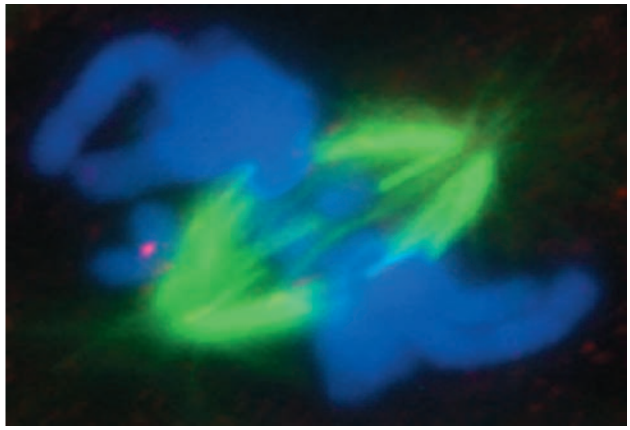


**FIGURA 14-31 El punto de control del ensamblaje del huso.** Micrografía de fluorescencia de una célula de mamífero en prometafase tardía, marcada con anticuerpos contra la proteína de punto de control del huso Mad2 (rosa) y tubulina de los microtúbulos (verde). Los cromosomas aparecen azules. Solo se ve que uno de los cromosomas de esta célula contiene Mad2, y este cromosoma aún no se ha alineado en la placa de la metafase. La presencia de Mad2 en el cinetocoro de este cromosoma es suficiente para prevenir la iniciación de la anafase.

FUENTE: Jennifer Waters, Rey-Huei Chen, Andrew W Murray y ED Salmon. *J Cell Biol* 1998;(141), cubierta núm. 5; reproducido con permiso de Rockefeller University Press.

## El punto de control de ensamblaje del huso

Como se discutió en la sección 14.5, las células poseen mecanismos de punto de control que monitorean el estado de los eventos durante el ciclo celular. Uno de estos puntos de verificación opera en la transición entre metafase y anafase. El **punto de control del ensamblaje del huso** (**SAC**, *spindle assembly checkpoint*), como se le llama, se revela mejor cuando un cromosoma no se alinea correctamente en la placa de la metafase. Cuando esto sucede, el mecanismo del punto de control demora el inicio de la anafase hasta que el cromosoma mal colocado haya asumido su posición adecuada a lo largo del ecuador del huso. Si una célula no fuera capaz de posponer la segregación cromosómica, elevaría en gran medida el riesgo de que las células hijas reciban un número anormal de cromosomas (aneuploidía). Esta expectativa se ha confirmado con la identificación de una serie de niños con deficiencias heredadas en una de las proteínas del punto de control del huso. Estos individuos presentan un desorden (denominado MVA), que se caracteriza por un alto porcentaje de células aneuploides y un gran aumento del riesgo de desarrollar cáncer.

¿Cómo determina la célula si todos los cromosomas están alineados correctamente en la placa de la metafase? Consideremos un cromosoma que solo está unido a los microtúbulos de un polo del huso, que es probablemente la circunstancia del cromosoma indeciso indicado por la flecha en la figura 14-23*a*). A través de un mecanismo que todavía no se conoce bien, los cinetocoros no ensamblados enlazan un complejo de proteínas que median el punto de control del ensamblaje del huso. La presencia de estas proteínas en un cinetocoro *no ensamblado* envía una señal de "espera" a la maquinaria del ciclo celular, que impide que la célula continúe la anafase. Una vez que el cromosoma indeciso se adhiere a las fibras del huso en ambos polos, y se alinea adecuadamente en la placa metafásica, el complejo de señalización abandona el cinetocoro, lo que apaga la señal de "espera" y permite que la célula progrese a la anafase.

La **FIGURA 14-31** muestra el huso mitótico de una célula que se detiene antes de la metafase, debido a un único cromosoma desalineado. A diferencia de todos los otros cinetocoros en esta célula, se ve que solo el cromosoma no alineado aún contiene proteína Mad2, un componente clave del complejo de punto de control del ensamblaje del huso. Los estudios han demostrado que la Mad2 puede cambiar entre dos conformaciones: un estado inactivo (cerrado) y otro activo (abierto). Durante la entrada mitótica, la Mad2 inactiva se recluta para los cinetocoros a través de su interacción con la Mad1. La unión a la Mad1 en el cinetocoro hace que la Mad2 cambie a su conformación activa y comience a reclutar, activar y liberar moléculas de Mad2 adicionales. Mientras se encuentra en la conformación activa, la Mad2 es capaz de unirse a la APC-activadora Cdc20. Durante el periodo en que la Cdc20 está unida a la Mad2, los complejos de APC no serían capaces de ubiquitinar el inhibidor anafásico, conservando así todas las cromátidas hermanas unidas entre sí por su "pegamento" cohesina. Cuando el cinetocoro se une a un microtúbulo, el complejo Mad1-Mad2 es echado fuera del cinetocoro, cesando el continuo reclutamiento y activación de la Mad2.

Está bien establecido que el punto de control del ensamblaje del huso se activa por la presencia de un cinetocoro no conectado, pero existen otras anomalías cromosómicas que surgen durante la progresión a la metafase que también requieren medidas correctivas. Por ejemplo, en ocasiones los dos cinetocoros de las cromátidas hermanas se unirán a los microtúbulos del mismo polo del huso, una condición conocida como un adjunto sintélico (paso 3a, figura 14-20*b*). Si no se corrige, un adjunto sintélico es muy probable que conduzca al movimiento de ambas cromátidas hermanas a una de las células hijas, dejando a la otra hija desprovista de este cromosoma. Es posible que la célula sea alertada de la presencia de un cromosoma con un adjunto sintélico por la falta de tensión en los cinetocoros del cromosoma. La tensión se desarrolla normalmente cuando las cromátidas hermanas son arrastradas por los microtúbulos desde los polos opuestos del huso (pasos 3-4, figura 14-20*b*).

Las células pueden corregir los adjuntos sintélicos (y otros tipos de conexiones anormales de microtúbulos) mediante la acción de una enzima llamada Aurora B cinasa, que es parte de un complejo de proteína móvil que reside en el centrómero durante la prometafase y la metafase. Entre los sustratos de la Aurora B cinasa se encuentran varias de las proteínas que se cree que están implicadas en la unión cinetocoro-microtúbulo, que incluyen miembros del complejo Ndc80 y la cinesina despolimerasa de la figura 14-30. Los estudios sugieren que las moléculas de Aurora B cinasa de un cromosoma unido incorrectamente fosforilan estos sustratos proteicos, lo que desestabiliza la unión de los microtúbulos a ambos cinetocoros. Una vez liberados de sus enlaces, los

cinetocoros de cada cromátida hermana tienen una nueva oportunidad de unirse a los microtúbulos de los polos opuestos del huso. La inhibición de la Aurora B cinasa, en las células o los extractos, conduce a la desalineación y la mala segregación de los cromosomas (véase figura 18-51).

**REPASO**

1. Describa los eventos que ocurren en una célula durante la prometafase y durante la anafase.
2. Describa las similitudes y diferencias en la dinámica de los microtúbulos entre la metafase y la anafase. ¿Cómo se relacionan las diferencias con los movimientos A y B de la anafase?

## 14.11 Telofase y citocinesis

A medida que los cromosomas se acercan a sus respectivos polos tienden a acumularse en una masa, lo que marca el comienzo de la etapa final de la mitosis o **telofase** (**FIGURAS 14-11** y **14-32**). Durante la telofase las células hijas regresan a la condición de interfase: el huso mitótico se desensambla, la envoltura nuclear se reforma, y los cromosomas se dispersan más y más, hasta que desaparecen de la vista bajo el microscopio. La verdadera partición del citoplasma en dos células hijas se produce por un proceso que se discutirá en breve. Sin embargo, echemos un vistazo atrás en primer lugar, y consideremos las proteínas motoras implicadas en varios de los principales movimientos cromosómicos que tienen lugar durante la mitosis.

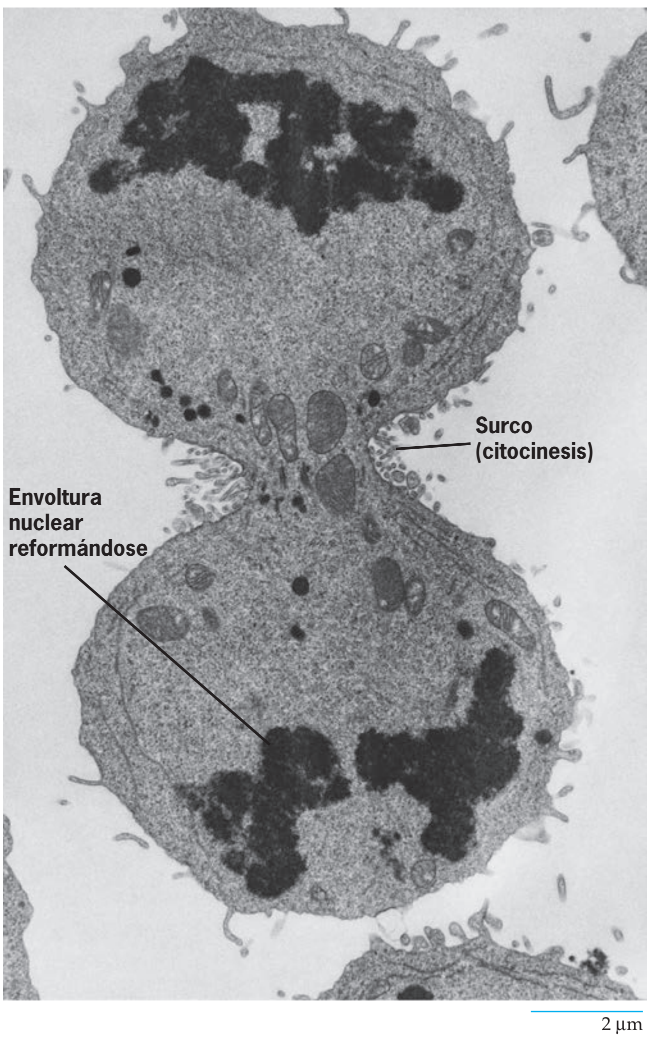



**FIGURA 14-32** **Telofase.** Microfotografía electrónica de una sección a través de un linfocito humano en la telofase.
FUENTE: David M Phillips/Photo Researchers, Inc.

### Proteínas motoras necesarias para los movimientos mitóticos

La mitosis se caracteriza por los amplios movimientos de las estructuras celulares. La profase está acompañada por el movimiento de los polos del huso a los extremos opuestos de la célula, la prometafase por el movimiento de los cromosomas al ecuador del huso, la anafase A por el movimiento de los cromosomas desde el ecuador del huso hasta sus polos, y la anafase B por la elongación del huso. Durante la última década se ha identificado una variedad de diversos motores moleculares, en diferentes ubicaciones de células mitóticas de especies muy diversas. Los motores implicados en los movimientos mitóticos son principalmente motores de microtúbulos, que incluyen un número de diferentes proteínas relacionadas con la cinesina y la dineína citoplásmica. Algunos de los motores se mueven hacia el extremo (+) del microtúbulo, otros hacia el extremo (–). Como se discutió con anterioridad, un grupo de cinesinas no se mueve a ninguna parte, pero promueve la polimerización de los microtúbulos. Las proteínas motoras se han localizado en los polos del huso, a lo largo de las fibras del huso, y dentro de ambos: cinetocoros y brazos de cromosomas. Aunque aún no se pueden extraer conclusiones firmes sobre las funciones de las proteínas motoras específicas, se sugiere una representación general de las funciones de estas moléculas (**FIGURA 14-33**):

- Es probable que las proteínas motoras localizadas a lo largo de los microtúbulos polares contribuyan manteniendo los polos separados (figura 14-33*a*, *b*).
- Es probable que las proteínas motoras residentes en los cromosomas sean importantes en los movimientos de los cromosomas durante la prometafase (figura 14-33*a*), en el mantenimiento de los cromosomas en la placa metafásica (figura 14-33*b*) y en la separación de los cromosomas durante la anafase (figura 14-33*c*).
- Es probable que las proteínas motoras situadas a lo largo de los microtúbulos polares, superpuestos en la región del ecuador del huso, sean responsables de entrecruzar microtúbulos antiparalelos y de deslizar uno sobre otro, alargando así el huso durante la anafase B (figura 14-33*c*).

### Citocinesis

La mitosis logra la segregación de cromosomas duplicados en los núcleos hijos, pero la célula se divide en dos células hijas mediante un proceso separado llamado *citocinesis*. El primer indicio de citocinesis en la mayoría de las células animales aparece durante la anafase como una indentación de la superficie celular, en una banda estrecha alrededor de la célula. A medida que pasa el tiempo, la indentación se profundiza para formar un surco que se mueve hacia adentro, hacia el centro de la célula. El plano del surco se encuentra en el mismo plano ocupado previamente por los cromosomas de la placa metafásica, de modo que los dos conjuntos de cromosomas se dividen finalmente en células diferentes (como en la figura 14-32). A medida que una célula se convierte en dos células, se administra una membrana plasmática adicional a la superficie de la célula, a través de vesículas citoplásmicas que se fusionan con el surco de división que avanza. En sus últimas etapas el surco que avanza pasa a través de los remanentes apretados de la porción central del huso mitótico, que forma un puen-

te citoplásmico entre las células hijas llamado *cuerpo central* (**FIGURA 14-34*a***). El paso final de la citocinesis se llama *abscisión*, cuando las superficies del surco de división se fusionan entre sí, dividiendo la célula en dos (figura 14-34*b*). La abscisión requiere la acción de los complejos ESCR —las mismas proteínas responsables de separar las vesículas intraluminales que se forman dentro de los endosomas— (p. 301).

Nuestro concepto actual del mecanismo responsable de la citocinesis proviene de una propuesta hecha por Douglas Marsland en la década de 1950 conocida como la *teoría del anillo contráctil* (**FIGURA 14-35*a***). Marsland propuso que la fuerza requerida para dividir una célula se genera en una banda delgada de citoplasma contráctil ubicada en la *corteza*, justo debajo de la membrana plasmática del surco. El examen microscópico de la corteza debajo del surco de una célula en corte revela la presencia de un gran número de filamentos de actina (figuras 14-35*b* y 14-36*a*). Estos filamentos ramificados se ensamblan en la corteza celular mediante la acción de una proteína formina (p. 352), que también puede anclar los filamentos a la membrana plasmática que los recubre.

Intercalados entre los filamentos de actina hay filamentos bipolares cortos de miosina, los cuales están compuestos de miosina II, como se evidencia por su unión de anticuerpos antimiosina

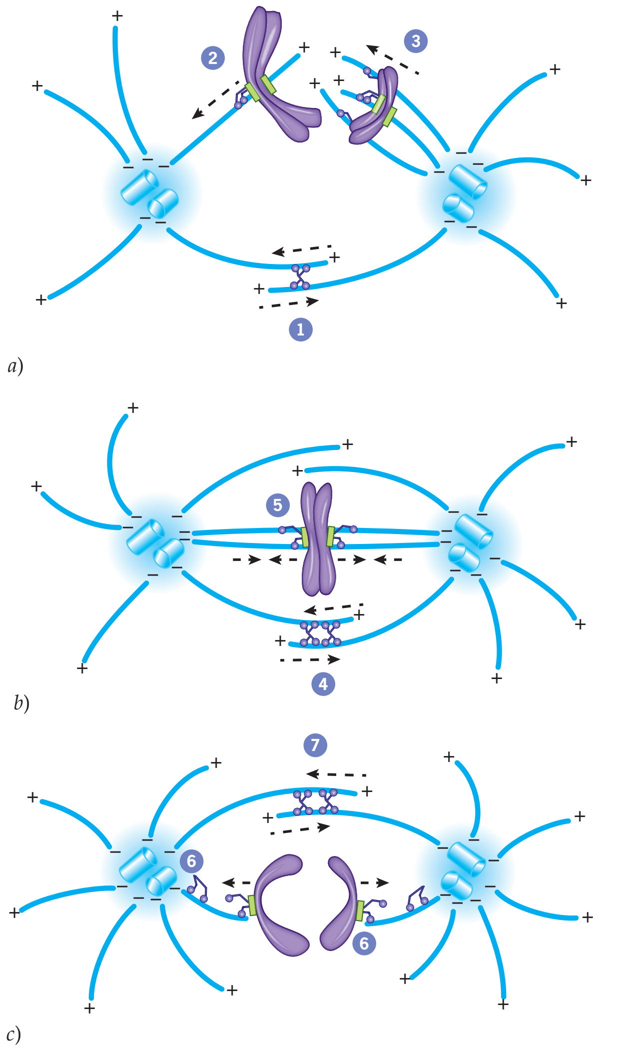



**FIGURA 14-33 Actividad propuesta de las proteínas motoras durante la mitosis.** *a*) Prometafase. Las dos mitades del huso mitótico se separan una de la otra de los polos opuestos, debido a la acción de los motores bipolares (cuatro cabezas) dirigidos al extremo (miembros de la familia cinesina-5). Estos motores se pueden unir por sus cabezas a microtúbulos antiparalelos de polos opuestos y hacer que se deslicen (paso 1). (Los motores adicionales asociados con los centrosomas y la corteza no se muestran). Mientras tanto, los cromosomas se han unido a los microtúbulos cromosómicos, y se pueden ver oscilando adelante y atrás a lo largo de los microtúbulos. En última instancia, los cromosomas se mueven al centro del eje, a medio camino entre los polos. Los movimientos de los cromosomas hacia el polo están mediados por motores dirigidos al extremo (–) (es decir, dineína citoplásmica) que residen en el cinetocoro (paso 2). Los movimientos cromosómicos alejados de los polos están mediados por motores dirigidos a los extremos (es decir, cinesinas) que residen en el cinetocoro, y especialmente a lo largo de los brazos del cromosoma (paso 3) (véase figura 14-21). *b*) Metafase. Las dos mitades del huso mantienen su separación como resultado de la actividad motora continua dirigida al extremo (+), asociada con los microtúbulos polares (paso 4). También se sospecha que la actividad motora asociada con el paso 4 promueve el flujo de subunidades dentro de estos microtúbulos, como se muestra en la figura 14-25. Se piensa que los cromosomas se mantienen en el plano ecuatorial mediante la actividad equilibrada de las proteínas motoras que residen en el cinetocoro, dirigidas al extremo (+) y al extremo (–) (paso 5). *c*) Anafase. Se cree que el movimiento de los cromosomas hacia los polos requiere de la actividad de las despolimerasas de cinesina que catalizan la despolimerización en los extremos (+) y (–) de los microtúbulos (paso 6). La separación de los polos (anafase B) se piensa que es el resultado de la actividad continua de los motores bipolares orientados a los extremos de los microtúbulos polares (paso 7).

FUENTE: KE Sawin y JM Scholey. *Trends Cell Biol* 1991;1:122. Trendsin Cell Biology by Elsevier Ltd. Reproducida con permiso de Elsevier Ltd en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Copyright Clearance Center.

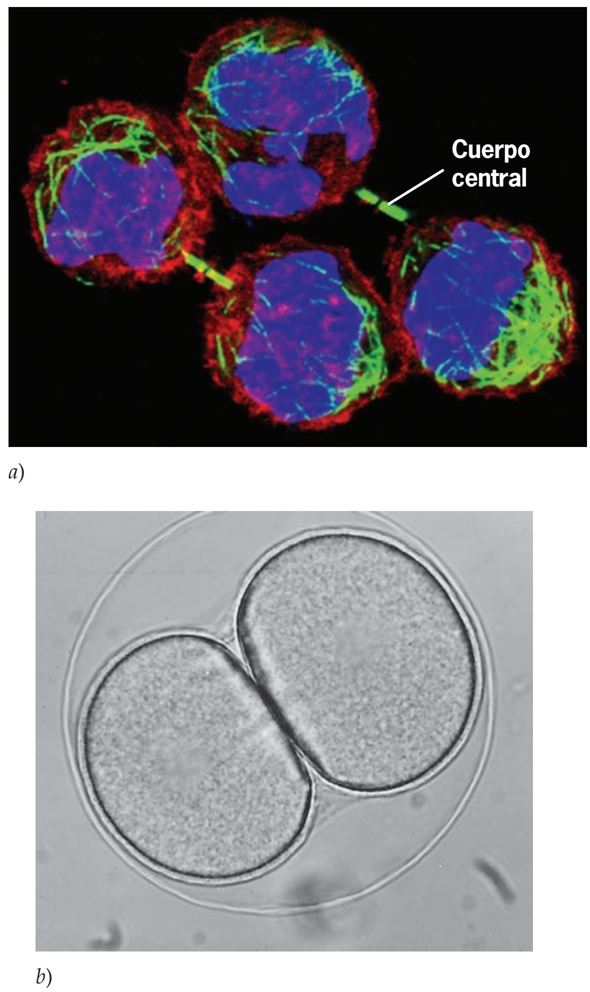
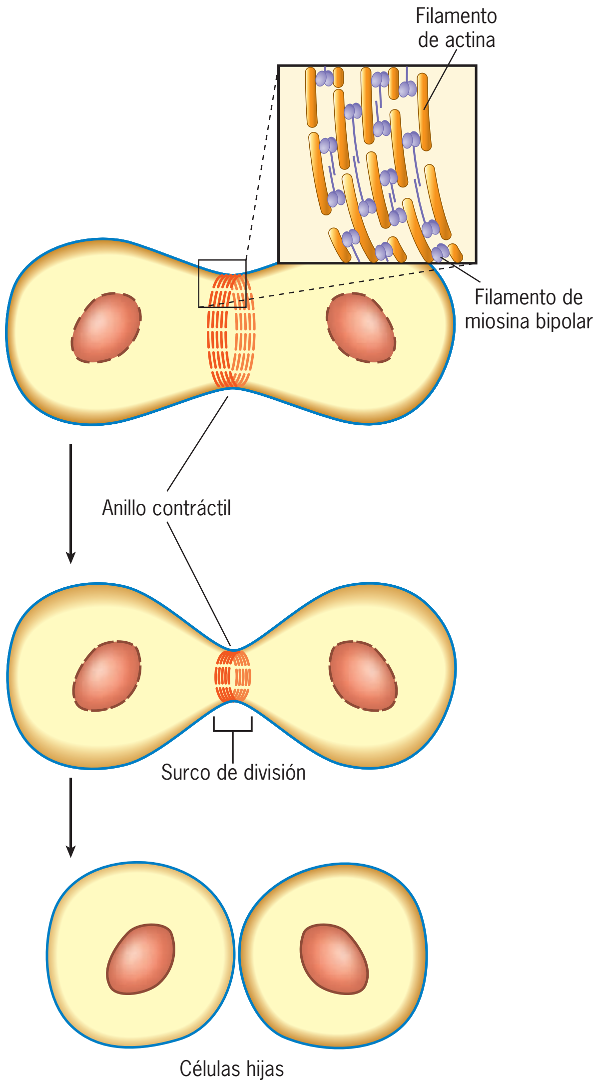


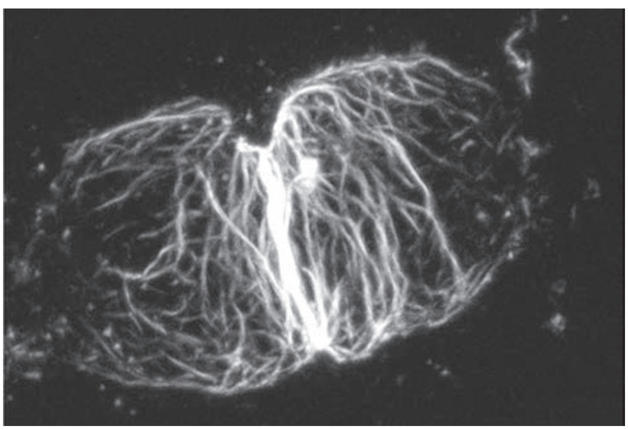

**FIGURA 14-34 Citocinesis** *a*) Estas células cultivadas de mamíferos están en el último paso de la citocinesis, llamada abscisión, en la cual el surco de evacuación atraviesa el cuerpo central, un delgado puente citoplásmico que se empaqueta con restos de la porción central del huso mitótico. Los microtúbulos son verdes, la actina es roja y el DNA es azul. *b*) Este huevo fertilizado de erizo de mar acaba de ser dividido en dos células por citocinesis.

FUENTE: *a*) Ahna R Skop, *et al*. *Science* 2004;305:61, fig. 1a. Reproducida con permiso de AAAS. *b*) Cortesía de Tryggve Gustafson.

II (**FIGURA 14-36*b***). La importancia de la miosina II en la citocinesis es evidente por el hecho de que 1) los anticuerpos antimiosina II causan el cese rápido de la citocinesis cuando se inyectan en una célula en división (figura 14-36*c*) y 2) las células que carecen de un gen funcional de miosina II llevan a cabo la división nuclear por mitosis, pero no se pueden dividir normalmente en células hijas. El ensamblaje de la maquinaria contráctil de actina-miosina en el plano del futuro surco de división está orquestado por una proteína G llamada RhoA. En su estado de unión al guanosín trifosfato GTP la RhoA activa una cascada de eventos, que conducen tanto al ensamblaje de los filamentos de actina como a la activación de la actividad motora de la miosina II. Si la RhoA se agota de las células, o se inactiva, fracasa el desarrollo del surco de división.



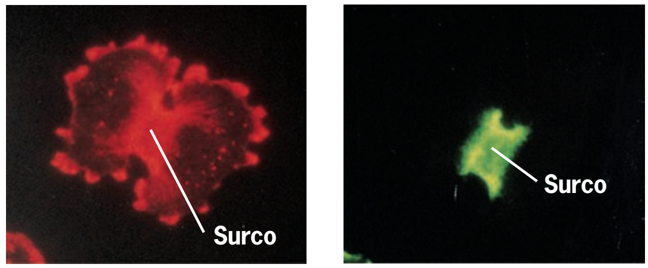

*a*)



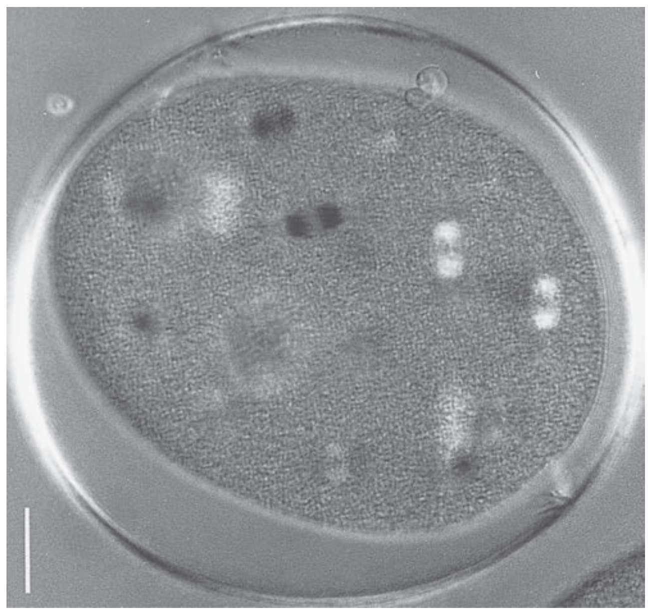
*b*)

**FIGURA 14-35 La formación y operación del anillo contráctil durante la citocinesis.** *a*) Los filamentos de actina se ensamblan en un anillo en el ecuador celular. La contracción del anillo, que requiere la acción de la miosina, causa la formación de un surco que divide la célula en dos. *b*) Micrografía confocal fluorescente de un espermatocito de mosca sometido a citocinesis al final de la primera división meiótica. Los filamentos de actina, que se han teñido con la toxina de hongos faloidina, se ven concentrados en una banda ecuatorial circular dentro del surco de división.

FUENTE: *b*) Daniel Saul, *et al*. *J Cell Science* 2004;117:3893, cubierta núm. 17, cortesía de Julie A Brill, con el permiso de Company of Biologists Ltd. http://jcs.biologists.org/content/117/17.cover-expansion




*a*) *b*) 10 μm



*c*) 30 μm

**FIGURA 14-36 Demostración experimental de la importancia de la miosina en la citocinesis.** *a*, *b*) Localización de la actina y la miosina II en una *Dictyostelium* ameba durante la citocinesis, como se demostró mediante inmunofluorescencia de doble tinción. *a*) Los filamentos de actina (rojo) se encuentran tanto en el surco de evacuación como en la periferia de la célula, donde desempeñan un papel clave en el movimiento celular (sección 9.10). *b*) La miosina II (verde) se localiza en la línea de división, donde forma parte de un anillo contráctil que abarca el ecuador. *c*) Un huevo de estrella de mar que había sido microinyectado con un anticuerpo contra miosina de estrella de mar, como se observó bajo luz polarizada (lo que hace que los husos mitóticos aparezcan más brillantes o más oscuros que el fondo, debido a la presencia de microtúbulos orientados). Mientras que la citocinesis ha sido completamente suprimida por los anticuerpos, la mitosis (como lo revelan los husos mitóticos) no se ve afectada.

FUENTE: *a-b*) Cortesía de Yoshio Fukui; *c*) Daniel P Kiehart, Issei Mabuchi y Shinya Inoué. *J Cell Biol* 1982;94:167, fig. 1. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

El mecanismo generador de fuerza que opera durante la citocinesis se cree que es similar a la contracción basada en la actina y la miosina de las células musculares. De hecho, el surco de citocinesis de una eucariota unicelular primitiva es el probable antecesor evolutivo de la maquinaria contráctil de las células musculares animales. Mientras que el deslizamiento de los filamentos de actina de una célula muscular provoca el acortamiento de la fibra muscular, el deslizamiento de los filamentos del anillo contráctil tira de la corteza y de la membrana plasmática adjunta hacia el centro de la célula. Como resultado, el anillo contráctil contrae la región ecuatorial de la célula, de manera similar a cuando se tira de las asas de una bolsa de cordón y la abertura se estrecha.

Por lo general se acepta que la posición del surco de división está determinada por la posición del eje mitótico anafásico, que induce la activación de la RhoA en un anillo estrecho dentro de la corteza. Sin embargo, ha habido un debate considerable en cuanto a cómo se selecciona esta zona particular dentro de la corteza. Los primeros estudios pioneros en huevos marinos de invertebrados por Ray Rappaport, del Union College en Nueva York, mostraron que el anillo contráctil se forma en un plano a medio camino de los polos de huso, aun si uno de los polos es desplazado por una microaguja insertada en la célula. Un ejemplo de la relación entre la posición del plano de división y los polos del huso se muestra en el experimento de la **FIGURA 14-37**. Estos estudios sugieren que el sitio del ensamblaje actina-filamento, y así el plano de citocinesis, está determinado por una señal que emana de los polos del huso. Se piensa que la señal viaja de los polos de huso a la corteza celular a lo largo de los microtúbulos astrales. Cuando la distancia entre los polos y la corteza se modifica experimentalmente, la duración de la citocinesis se puede alterar espectacularmente (figura 14-37). Los estudios recientes sugieren que la actividad observada por Rappaport puede ser realizada por un complejo de proteínas conocido como *centralspindlin*. El centralspindlin, que incluye una proteína tipo cinesina y un activador de la RhoA, se localiza al final de los terminales (+) de los microtúbulos antiparalelos en el cuerpo central del huso, donde entonces se piensa que activa la RhoA para iniciar la formación del surco de división.

También se ha observado que un segundo complejo de señales, conocido como el complejo cromosómico de pasajeros (CPC, *chromosomal passenger complex*), se acumula en el cuerpo central del huso, e igualmente se piensa que regula la formación del surco de división. Un miembro clave del CPC es la cinasa Aurora B, que se discutió previamente como ejecutora de un papel regulador importante en los adjuntos cinetocoro-microtúbulo y otros eventos mitóticos (p. 566). La actividad de la aurora B cinasa en el cuerpo central parece regular el tiempo de abscisión, asegurando que la división de la membrana no ocurre si los cromosomas están presentes en el cuerpo central, y también ha sido implicada en regular la descondensación de la cromatina que sigue a la mitosis.

## Citocinesis en células vegetales: formación de la placa celular

Las células vegetales, que están encerradas en una relativamente inextensible pared celular, se someten a citocinesis por un mecanismo muy distinto. A diferencia de las células animales, que se estrechan por un surco que avanza hacia dentro desde la superficie externa de la célula externa, las células vegetales deben construir una pared extracelular dentro de una célula viva. La formación de la pared comienza en el centro de la célula y crece hacia afuera, a encontrar las paredes laterales existentes. La formación de una nueva célula comienza con la construcción de un precursor más simple, llamado la **placa celular**.

El plano en el cual se forma la placa celular es perpendicular al eje del huso mitótico, pero a diferencia del caso de la célula animal, el plano no está determinado por la posición del huso, ni se determina más tarde en la mitosis. Más bien la orientación de ambos, placa celular y huso mitótico, lo determina un cinturón de microtúbulos corticales —la *cinta de preprofase*— que se forma

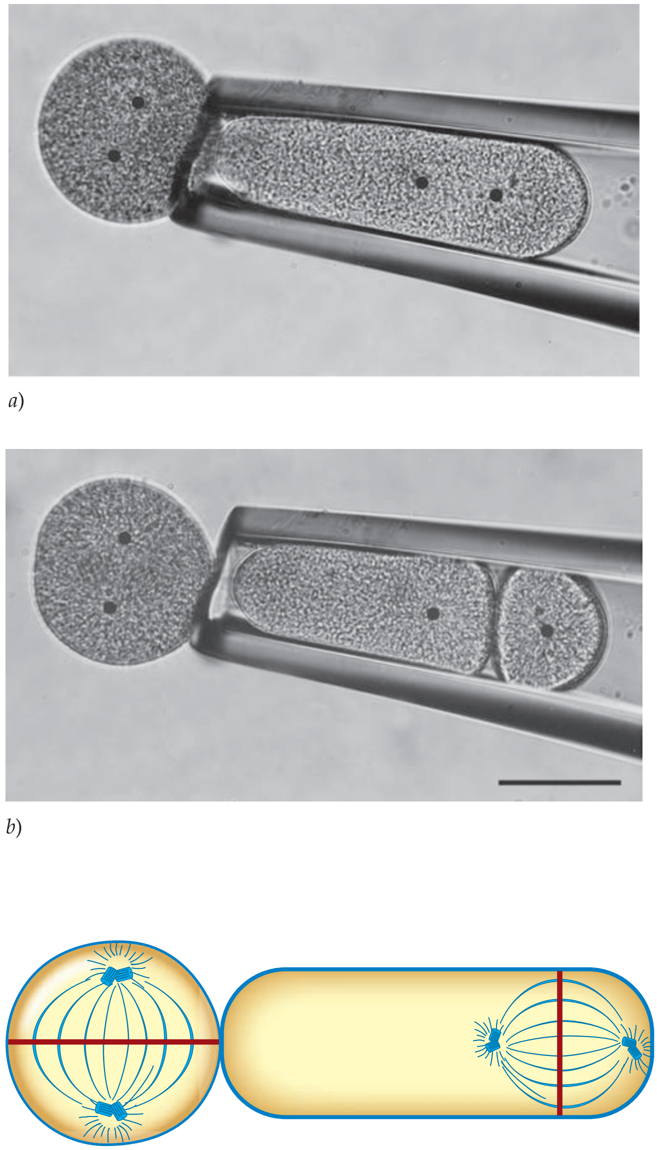

*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 14-37 El sitio de la formación del plano de división y el instante en el cual ocurre la división depende de la posición del huso mitótico.** *a*) A este huevo de equinodermo se le permitió dividirse una vez para formar un embrión bicelular. Entonces, una vez que el huso mitótico apareció en cada una de las dos células, una de ellas se hizo entrar en una micropipeta, haciendo que asumiera una forma cilíndrica. Los dos puntos oscuros en cada célula son los polos del huso que se formaron antes de la segunda división de cada célula. *b*) Nueve minutos más tarde, la célula cilíndrica ha completado la división, mientras la célula esférica todavía no ha comenzado a dividirse. Estas fotos indican que 1) el plano de división se forma entre los polos de huso, con independencia de su posición, y 2) la división ocurre más rápido en la célula cilíndrica. La barra es igual a 80 mm. *c*) Estos resultados se pueden explicar suponiendo que 1) el plano de división (barra marrón) se forma donde los microtúbulos astrales se solapan, y 2) la división ocurre antes en la célula cilíndrica porque la distancia de los polos (esferas azules) al sitio de la división se reduce, acortando así el tiempo que le toma a la señal de división alcanzar la superficie.

FUENTE: *a-b*) Charles B Shuster y David R Burgess. *J Cell Biol* 1999;146:987, fig. 5. Reproducida con permiso de Rockefeller University Press.

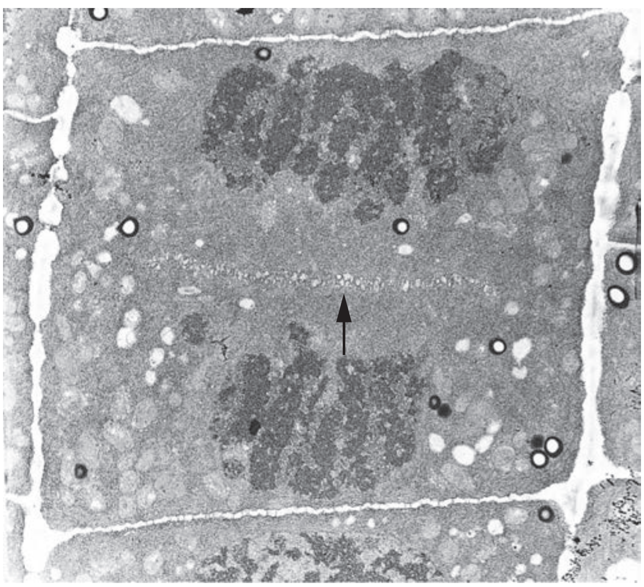
en el $G_2$ tardío (véase figura 9-15). Aunque la cinta de preprofase se desintegra al llegar a la prometafase, deja una impresión invisible que determina el futuro sitio de división. La primera señal de la formación de la placa celular se ve en la anafase tardía, cuando aparece el fragmoplasto en el centro de la célula en división. El **fragmoplasto** consiste en racimos de microtúbulos interdigitados, orientados de forma perpendicular a la futura placa (figura 9-15), junto a filamentos de actina, vesículas membranosas y material denso en electrones. Los microtúbulos de los fragmoplastos, que provienen de remanentes del huso mitótico, sirven de vía para el movimiento de pequeñas vesículas secretoras derivadas del Golgi en la región. Las vesículas se alinean a lo largo de un plano entre los núcleos hija (**FIGURA 14-38*a***). Las micrografías de electrones de células de tabaco congeladas han revelado con rapidez los pasos en que las vesículas derivadas de la Golgi se reorganizan en la placa celular. Para comenzar el proceso (paso 1, figura 14-38*b*), las vesículas envían túbulos como dedos que contactan y se fusionan con vesículas vecinas, para formar una red tubular interconectada en el centro de la célula (paso 2). Entonces, vesículas adicionales se dirigen a lo largo de los microtúbulos hacia los bordes laterales de la red. Las vesículas recién llegadas continúan el proceso de formación y fusión de túbulos, que extiende la red hacia afuera (paso 2). Eventualmente el borde guía de la red de crecimiento entra en contacto con la membrana de plasma parental en la frontera de la célula (paso 3). Al final, la red tubular pierde sus gaps citoplásmicos y madura en una partición continua y aplanada. Las membranas de la red tubular se convierten en las membranas plasmáticas de las dos células hijas adyacentes, mientras que los productos secretorios que se han transportado dentro de las vesículas contribuyen a la placa celular intermedia. Una vez que se completa la placa celular, se agregan celulosa y otros materiales para producir la pared celular madura.

**REPASO**

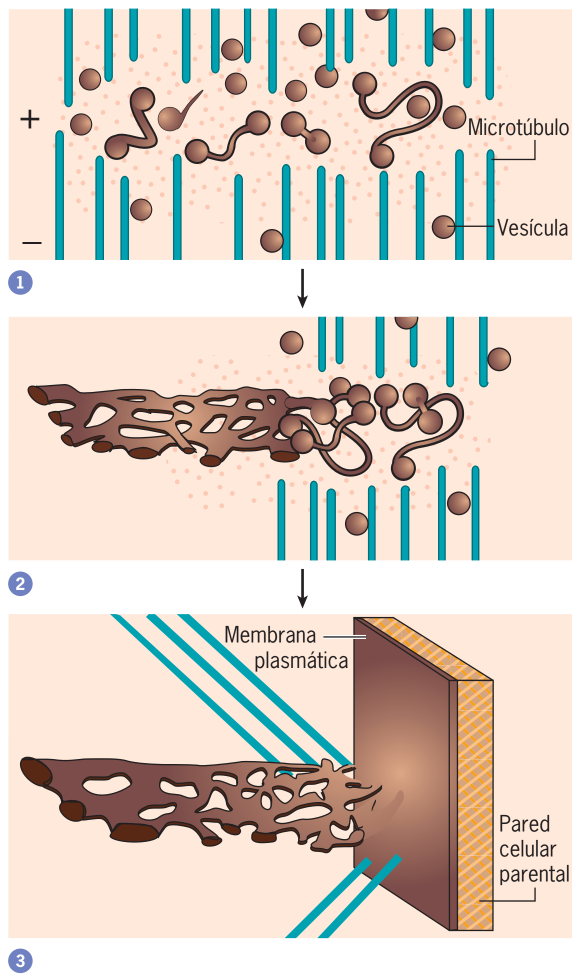
1. ¿Qué tipos de mecanismos de generación de fuerza podrían ser responsables del movimiento cromosómico durante la fase anafásica?
2. Contraste los eventos que ocurren durante la citocinesis en células típicas vegetales y animales.

## 14.12 Descripción general de la meiosis

La producción de hijos por reproducción sexual incluye la unión de dos células, cada una con un conjunto haploide de cromosomas. Como se discutió en el capítulo 10, la duplicación del número de cromosomas en la fecundación se compensa por una reducción equivalente en el número de cromosomas, en una etapa anterior a la formación de los gametos. Esto se logra mediante la **meiosis**, un término acuñado en 1905 que proviene de la palabra griega que significa "reducción". La meiosis asegura la producción de una fase haploide en el ciclo de vida, y la fertilización asegura una fase diploide. Sin meiosis el número de cromosomas



*a*)




*b*)

**FIGURA 14-38 La formación de una placa celular entre dos núcleos de plantas hijas durante la citocinesis.** *a*) Una micrografía electrónica de bajo aumento que muestra la formación de la placa celular entre las futuras células hijas. Las vesículas secretorias derivadas de los complejos de Golgi cercanos se han alineado a lo largo del plano ecuatorial (flecha), y están comenzando a fusionarse entre sí. La membrana de las vesículas forma las membranas plasmáticas de las dos células hijas, y el contenido de las vesículas proporcionará el material que forma la placa celular que separa las células. *b*) Pasos en la formación de la placa celular como se describe en el texto.

FUENTE: *a*) David Phillips/Photo Researchers, Inc; *b*) AL Samuels, TH Giddings, Jr, y LA Staehelin. *Journal Cell Biology* 1995;130:1354. The Journal of Cell Biology de Rockefeller Institute; American Society for Cell Biology. Copyright 1995, reproducida con autorización de Rockefeller University Press en el formato de republicación en un libro de texto vía Copyright Clearance Center.

 se duplicaría con cada generación, y no sería posible la reproducción sexual.

Para comparar los eventos de la mitosis y la meiosis, debemos examinar el destino de las cromátidas. Antes de la mitosis y la meiosis, las células diploides $G_2$ contienen pares de cromosomas homólogos, y cada cromosoma consta de dos cromátidas. Durante la mitosis las cromátidas de cada cromosoma se dividen, y se separan en dos núcleos hijos en una *sola* división. Como resultado, las células producidas por mitosis contienen pares de cromosomas homólogos, y son genéticamente idénticas a sus padres. En cambio, durante la meiosis las cuatro cromátidas de un par de cromosomas homólogos replicados se distribuyen entre cuatro núcleos hijas. La meiosis cumple esta función al incorporar dos divisiones secuenciales, sin un campo intermedio de replicación del DNA (**FIGURA 14-39**). En la primera división meiótica cada cromosoma (que consta de dos cromátidas) se separa de su homólogo. Como resultado, cada célula hija contiene solo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Para que esto suceda los cromosomas homólogos se emparejan durante la profase de la primera división meiótica (profase I, figura 14-39) mediante un elaborado proceso que no tiene contrapartida en la mitosis. Como están emparejados, los cromosomas homólogos participan en un proceso de recombinación genética, que produce cromosomas con nuevas combinaciones de alelos maternos y paternos (véase metafase I, figura 14-39). En la segunda división meiótica las dos cromátidas de cada cromosoma se separan una de la otra (anafase II, figura 14-39).

Una revisión de varias eucariotas revela marcadas diferencias con respecto a la etapa dentro del ciclo de vida en el que ocurre la meiosis, y en la duración de la fase haploide. Sobre estas bases se pueden identificar los tres grupos siguientes (figura 14-40):

1. ***Meiosis gamética o terminal.*** En este grupo, que incluye a todos los animales multicelulares y muchos protistas, las divisiones meióticas están estrechamente vinculadas a la formación de los gametos (**FIGURA 14-40**, izquierda). En los vertebrados masculinos (**FIGURA 14-41*a***), por ejemplo, la meiosis ocurre justo antes de la diferenciación de los espermatozoides. Las *espermatogonias* que se comprometen a someterse a la meiosis se convierten en *espermatocitos primarios*, que luego experimentan las dos divisiones de la meiosis para producir cuatro *espermátidas* relativamente indiferenciadas. Cada espermátida experimenta una diferenciación compleja para convertirse en una célula de esperma altamente especializada (*espermatozoide*). En los vertebrados hembras (figura 14-41*b*), la *ovogonia* se convierte en *ovocitos primarios*, que luego entran en una profase meiótica muy extendida. Durante esta profase el ovocito primario crece, y se llena de yema y otros materiales. Solamente después de completada la diferenciación del ovocito (es decir, que el ovocito ha alcanzado en esencia el mismo estado que cuando se fertiliza) ocurren las divisiones meióticas. Es típico que los huevos de vertebrados se fecundan en una etapa antes de la finalización de la meiosis (por lo general en la metafase II). La meiosis se completa después de la fertilización, mientras que el esperma reside en el citoplasma del huevo.
2. ***Meiosis cigótica o inicial.*** En este grupo, que incluye solo protistas y hongos, las divisiones meióticas ocurren justo después de la fertilización para producir esporas haploides (figura 14-40, derecha). Las esporas se dividen por mitosis para producir una generación adulta haploide. En consecuencia, la etapa diploide del ciclo de vida se limita a un periodo breve después de la fecundación, cuando el individuo sigue siendo un cigoto.
3. ***Meiosis en esporas o intermedia.*** En este grupo, que incluye plantas y algunas algas, las divisiones meióticas tienen lugar en una etapa no relacionada con la formación o fertilización de gametos (figura 14-40, centro). Si comenzamos el ciclo de vida con la unión de un gameto masculino (el grano de polen) y un gameto femenino (el huevo), el cigoto diploide sufre mitosis y se desarrolla en un diploide **esporófito**. En alguna etapa del desarrollo del esporófito ocurre la *esporogénesis* (que

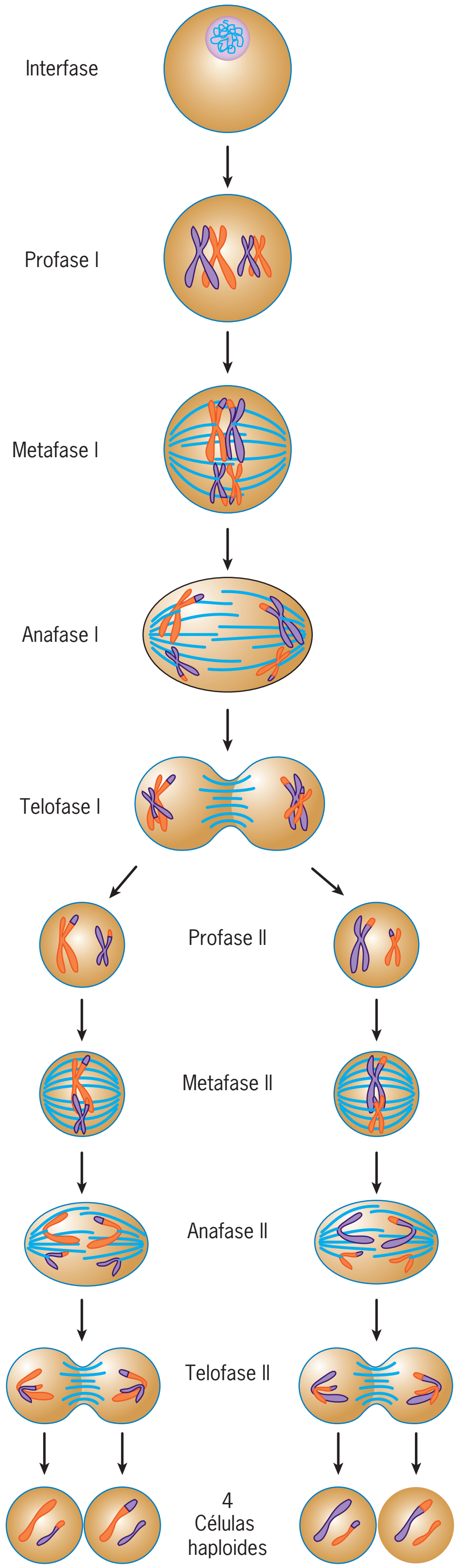



**FIGURA 14-39 Las etapas de la meiosis.**

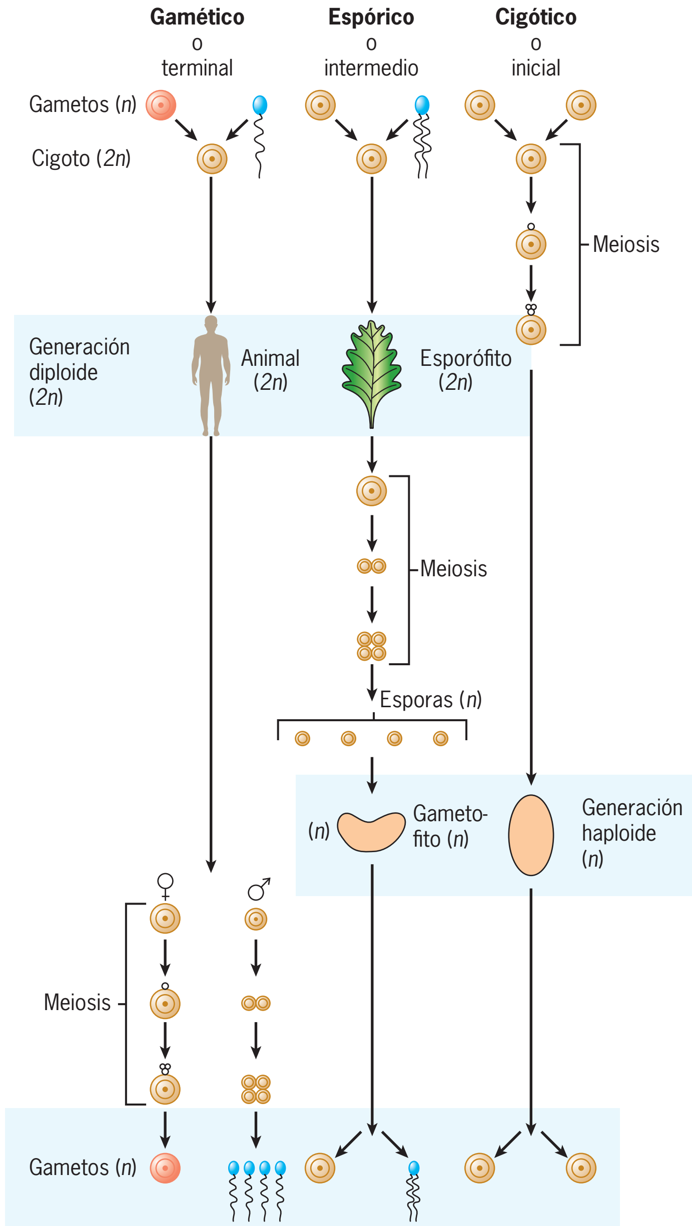



**FIGURA 14-40 Una comparación de tres grupos principales de organismos en función de la etapa dentro del ciclo de vida en que se produce la meiosis y la duración de la fase haploide.**

FUENTE: Wilson Edmund B. *The Cell in Development and Heredity*, copyright 1987. Reproducida con permiso de Taylor & Francis Group Llc-Books en formato libro de texto a través del Copyright Clearance Center.

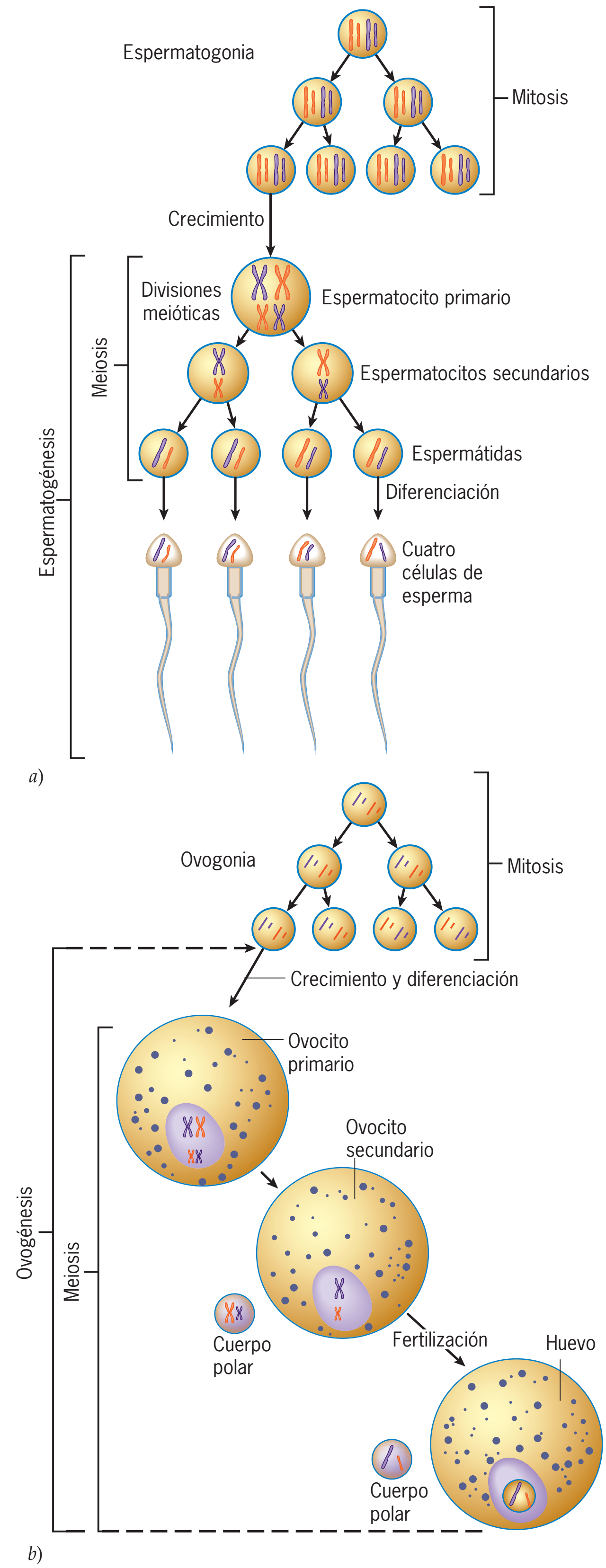



**FIGURA 14-41 Las etapas de la gametogénesis en los vertebrados: comparación entre la formación de la esperma y los huevos.** En ambos sexos una población relativamente pequeña de células germinales primordiales, presentes en el embrión, proliferan por mitosis para formar una población de células gonadales (espermatogonias u ovogonias), a partir de las cuales los gametos se diferencian. En el hombre *a*), la meiosis ocurre antes de la diferenciación, mientras que en la mujer *b*), ambas divisiones meióticas ocurren después de la diferenciación. Cada espermatocito primario por lo general da lugar a cuatro gametos viables, mientras que cada ovocito primario forma solo un huevo fertilizable, y dos o tres cuerpos polares.

incluye la meiosis), y produce esporas que germinan directamente en un **gametófito** haploide. El gametófito puede ser una etapa independiente o, como en el caso de las plantas de vivero, una pequeña estructura retenida dentro de los óvulos. En ambos casos los gametos se producen a partir del gametófito haploide por *mitosis*.

## REPASO

1. Contraste las funciones generales de la mitosis y la meiosis en la vida de una planta o animal. ¿Cómo se diferencian los núcleos formados por estos dos procesos?
2. Contraste la secuencia temporal de la meiosis en la espermatogénesis contra la ovogénesis.

## 14.13 Las etapas de la meiosis



Al igual que con la mitosis, el preludio de la meiosis incluye la replicación del DNA. La fase S premeiótica por lo general toma varias veces más tiempo que una fase S premitótica. La profase de la primera división meiótica (es decir, la profase I) usualmente se alarga de manera extraordinaria cuando se compara con la profase mitótica. En la hembra humana, por ejemplo, los ovocitos inician la profase I de la meiosis antes del nacimiento, y luego entran en un periodo de detención prolongada. Los ovocitos reanudan la meiosis justo antes del momento en que se ovulan, lo que ocurre cada 28 días después de que la persona alcanza la pubertad. En consecuencia, muchos ovocitos humanos permanecen detenidos en la misma etapa aproximada de la profase durante varias décadas. La primera profase meiótica también es muy compleja y habitualmente se divide en varias etapas, que son similares en todas las eucariotas de reproducción sexual (**FIGURA 14-42**).

La primera etapa de la profase I es el *leptoteno*, durante la cual los cromosomas se compactan y son visibles en el microscopio óptico. Aunque los cromosomas se han replicado en una etapa anterior, no hay ninguna indicación de que cada cromosoma esté compuesto de un par de cromátidas idénticas. Sin embargo, en el microscopio electrónico se revela que los cromosomas están compuestos de cromátidas emparejadas.

La segunda etapa de la profase I, llamada *cigoteno*, está marcada por la asociación visible de homólogos entre sí. Este proceso de emparejamiento cromosómico se llama **sinapsis** y es un evento intrigante que presenta preguntas importantes sin respuesta: ¿Sobre qué bases los homólogos se reconocen entre sí? ¿Cómo las parejas llegan a estar tan perfectamente alineadas? ¿Cuándo ocurre el reconocimiento entre homólogos por primera vez? Estudios recientes han arrojado luz que responden a estas interrogantes. Se ha supuesto durante años que la interacción entre cromosomas homólogos comienza primero cuando los cromosomas inician la sinapsis. Sin embargo, las investigaciones sobre células de levadura realizados por Nancy Klecknerand y sus colegas en la Universidad de Harvard, demostraron que las regiones homólogas de DNA de cromosomas homólogos ya están asociadas entre sí durante el leptoteno. La compactación cromosómica y la sinapsis durante el cigoteno simplemente hacen que esta disposición sea visible a través del microscopio. Como se analizará a continuación, el primer paso en la recombinación genética es la introducción deliberada de roturas de doble hebra en moléculas de DNA alineadas. Los estudios, tanto en levadura como en ratones, sugieren que las roturas de DNA ocurren en el leptoteno, mucho antes de que los cromosomas se emparejen visiblemente.

Estos hallazgos están respaldados por investigaciones destinadas a localizar secuencias particulares de DNA dentro de los núcleos de células meióticas y premeióticas. En la sección 12.8 se vio que los cromosomas individuales ocupan regiones discretas dentro de los núcleos, en lugar de dispersarse de manera aleatoria en todo el espacio nuclear. Cuando se examinan las células de levadura a punto de ingresar a la profase meiótica, se encuentra que cada par de cromosomas homólogos comparte un territorio conjunto diferente a los compartidos por otros pares de homólogos. Este hallazgo sugiere que los cromosomas homólogos se emparejan en cierta medida antes del inicio de la profase meiótica. Los telómeros (segmentos terminales) de los cromosomas del leptoteno se distribuyen por todo el núcleo. Entonces, cerca del final del leptoteno, en muchas especies existe una reorganización espectacular de los cromosomas, de manera que los telómeros se localizan en la superficie interna de la envoltura nuclear en un lado del núcleo. La agrupación de los telómeros en un extremo de la envoltura nuclear se produce en una amplia variedad de eucariotas, y hace que los cromosomas se asemejen a los tallos agrupados de un ramo de flores (**FIGURA 14-43**). Los ratones que portan mutaciones que impiden la asociación de los cromosomas con la envoltura nuclear exhiben defectos en la sinapsis, la recombinación genética y la formación de gametos. Estos resultados experimentales sugieren que la envoltura nuclear realiza un papel importante en la interacción entre cromosomas homólogos durante la meiosis.

Un reciente estudio en levaduras con fisión ha demostrado que los RNA no codificantes (meiRNA) también puede que desempeñen un papel clave en el emparejamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis. Se observaron meiRNA transcritos a partir de ciertos *loci* a lo largo de un cromosoma, y parecieron emparejarse con transcritos de meiRNA análogos en el cromosoma homólogo, lo que condujo al emparejamiento de los cromosomas. Se necesitan más investigaciones para determinar la prevalencia de este mecanismo en diferentes organismos. Las

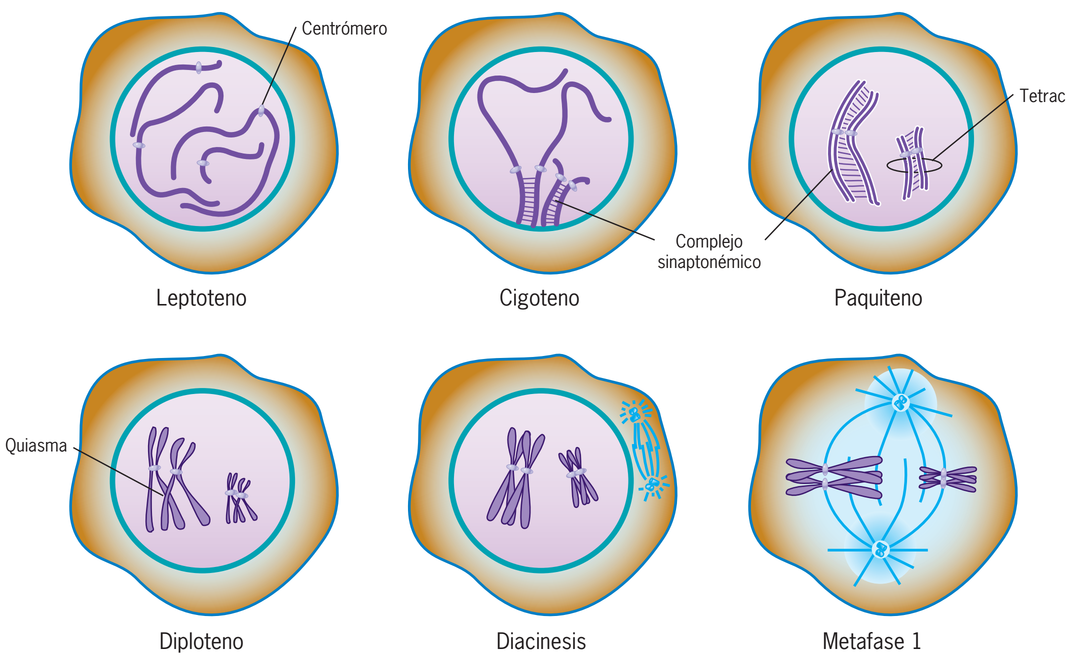



**FIGURA 14-42 Las etapas de la profase I.** Los eventos en cada etapa se describen en el texto.




**FIGURA 14-43 Asociación de los telómeros de los cromosomas meióticos con la envoltura nuclear.** Los cromosomas del saltamontes masculino en la etapa de profase meiótica, donde los cromosomas homólogos se asocian físicamente como parte de un bivalente. Los bivalentes están dispuestos en un "ramo" bien definido, con sus regiones terminales agrupadas cerca de la superficie interna de la envoltura nuclear en la base de la foto.

FUENTE: B John, *Meiosis*, © 1990. Cambridge University Press. Reproducida con permiso. Cortesía de Bernard John.

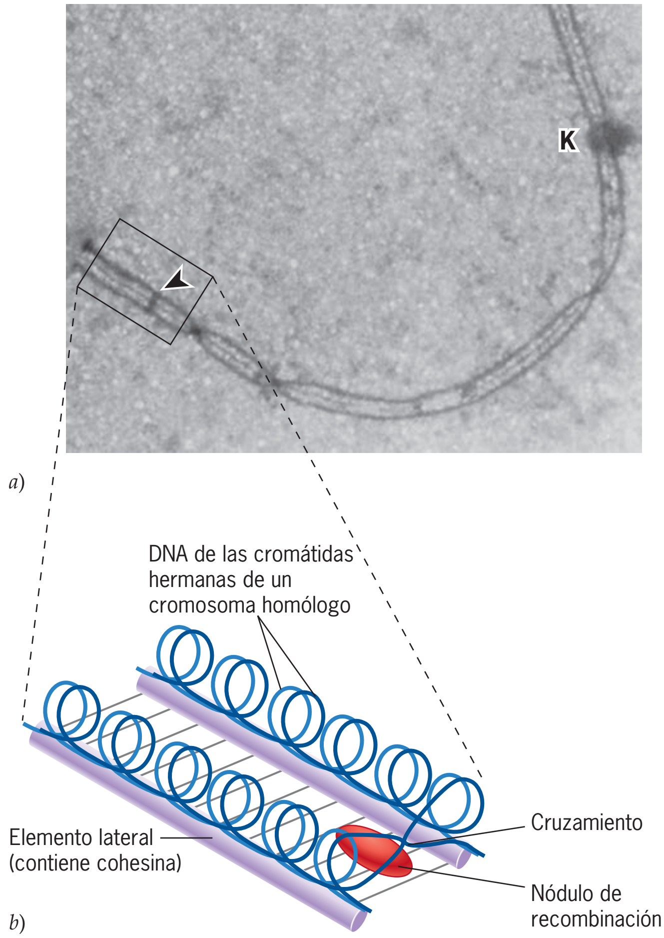



**FIGURA 14-44 El complejo sinaptonémico.** *a*) Micrografía electrónica de un paquiteno humano bivalente en el cual se muestra un par de cromosomas homólogos en un arreglo apretado, paralelo y ordenado. K (*kinetochore*): cinetocoro. *b*) Diagrama esquemático del complejo sinaptonémico y sus fibras cromosómicas asociadas. Los gránulos densos (nódulos de recombinación) vistos en el centro del SC (indicado por la punta de flecha en la parte *a*) contienen la maquinaria enzimática necesaria para completar la recombinación genética, que se cree comienza en una etapa mucho más temprana en la profase I. Se representan lazos de DNA emparejados íntimamente de dos cromátidas hermanas de cada cromosoma. Es probable que los lazos se mantengan en una configuración pareada mediante cohesión (no mostrado). Se presume que la recombinación genética (intercambio de segmentos de cromosomas) se produce entre los lazos de DNA de las cromátidas no hermanas como se muestra en la figura.

FUENTE: Cortesía de Alberto J Solari. *Chromosoma* 1980;81:330. Con permiso de Springer Science 1 Business Media.

micrografías electrónicas indican que la sinapsis cromosómica se acompaña de la formación de una estructura compleja llamada complejo sinaptonémico. El **complejo sinaptonémico (SC**, *synaptonemal complex*) es una estructura en forma de escalera con filamentos de proteínas transversales que conectan los dos elementos laterales (**FIGURA 14-44**). La cromatina de cada homólogo se organiza en lazos que se extienden desde uno de los elementos laterales del SC (figura 14-44*b*). Los elementos laterales están compuestos principalmente de cohesina (figura 14-14), que presumiblemente une la cromatina de las cromátides hermanas. Durante muchos años se pensó que el SC tenía cada par de cromosomas homólogos en la posición adecuada para iniciar la recombinación genética entre cadenas de DNA homólogo. Ahora es evidente que el SC no es necesario para la recombinación genética. No solo se usa la forma SC después de que se ha iniciado la recombinación genética, sino que las células de levadura mutantes incapaces de ensamblar un SC pueden participar en el intercambio de información genética entre los homólogos. Hoy se piensa que el SC funciona principalmente como un marco para permitir que las cromátidas interactúen para completar sus actividades de cruzamiento como se describe más adelante.

El complejo formado por un par de cromosomas homólogos sinapsados se llama un **bivalente** o una **tétrada**. El primer término refleja el hecho de que el complejo contiene dos homólogos, mientras que el otro llama la atención sobre la presencia de cuatro cromátidas. El final de la sinapsis marca el final del cigoteno y el comienzo de la próxima etapa de la profase I, llamada *paquiteno* (figura 14-44*a*), que se caracteriza por un complejo sinaptonémico completamente formado. Durante el paquiteno los homólogos se mantienen muy juntos a lo largo de su longitud por el SC. El DNA de las cromátidas hermanas se extiende en lazos paralelos (figura 14-44*b*). A través del microscopio electrónico se observan varios cuerpos electrodensos de casi 100 nm de diámetro dentro del centro del SC. Estas estructuras han sido denominadas *nódulos de recombinación* porque corresponden a los sitios donde tiene lugar el intercambio de segmentos cromosómicos, como se evidencia por la síntesis asociada de DNA que ocurre durante los pasos intermedios de recombinación (sección 14.15). Los nódulos de recombinación contienen la maquinaria enzimática que facilita la recombinación genética, que se completa al final del paquinema.

El comienzo del *diploteno*, la próxima etapa de la profase meiótica I, (figura 14-42) se reconoce por la disolución del SC, que deja los cromosomas unidos entre sí en puntos específicos por estructuras en forma de X, denominadas **quiasmas** (**FIGURA 14-45**). Estas se localizan en los sitios de los cromosomas donde se había producido un cruce entre las moléculas de DNA de los dos cromosomas. Los quiasmas se forman por enlaces covalentes entre una cromátida de un homólogo y una cromátida no hermana del otro homólogo. Estos puntos de unión proporcionan una visualización llamativa del alcance de la recombinación genética. Los quiasmas se hacen más visibles por la tendencia de los homólogos a separarse unos de otros en la etapa diploteno.

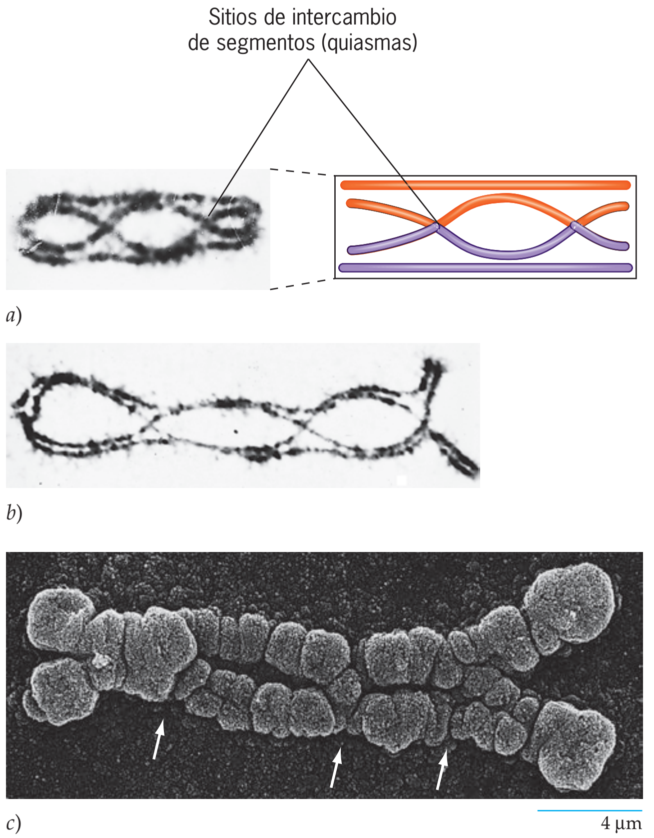



**FIGURA 14-45 Evidencia visible del entrecruzamiento de segmentos.** *a*, *b*) Bivalentes diploteno del saltamontes que muestran los quiasmas formados entre las cromátidas de cada cromosoma homólogo. El recuadro adjunto indica los cruces que se han producido, presumiblemente dentro del bivalente en *a*). Las cromátidas de cada cromosoma diploteno están estrechamente relacionadas, excepto en los quiasmas. *c*) Micrografía electrónica de barrido de un bivalente del insecto langosta del desierto con tres quiasmas (flechas).

FUENTE: *a-b*) De Bernard John. *Meiosis* © 1990 Cambridge University Press. Reimpreso con permiso. *c*) De Klaus Werner Wolf. *BioEss* 1994;16:108. Reproducida con permiso de John Wiley & Sons.

En los vertebrados, el diploteno puede ser una fase muy extendida de ovogénesis, durante la cual se produce la mayor parte del crecimiento de los ovocitos. Así, el diploteno puede ser un periodo de intensa actividad metabólica. La transcripción en el ovocito durante el diploteno proporciona el RNA utilizado para la síntesis de proteínas durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización.

Durante la etapa final de la profase meiótica I, llamada *diacinesis*, se ensambla el huso meiótico y se preparan los cromosomas para la separación. En aquellas especies en las que los cromosomas se dispersan rápidamente durante el diploteno, los cromosomas se recompactan durante la diacinesis. Esta termina con la desaparición del nucléolo, la ruptura de la envoltura nuclear y el movimiento de las tétradas cromosómicas hacia la placa metafásica. En los vertebrados ovocitos estos eventos se desencadenan por un aumento en el nivel de actividad de la proteína cinasa del factor promotor de maduración MPF. Como se discutió en las "Vías experimentales" en la sección 14.3, el MPF se identificó por primera vez por su capacidad de iniciar estos eventos, que representan la *maduración* del ovocito (sección 14.3).

En la mayoría de las especies eucarióticas aún se pueden ver quiasmas en cromosomas homólogos alineados en la placa metafásica de la meiosis I. De hecho, se requieren quiasmas para mantener los homólogos juntos como un bivalente durante esta etapa. En humanos y otros vertebrados cada pareja de homólogos por lo general contiene al menos un quiasma, mientras que los cromosomas más largos tienden a tener dos o tres de ellos. Se cree que existe algún mecanismo para garantizar que incluso los cromosomas más pequeños formen un quiasma. Si no se produce un quiasma entre un par de cromosomas homólogos, los cromosomas de esa bivalencia tienden a separarse uno del otro después de la disolución de la SC. Esta separación prematura de homólogos resulta a menudo en la formación de núcleos con un número anormal de cromosomas. Las consecuencias de tal evento se discuten en la "Perspectiva humana" (sección 14.14).

En la metafase I los dos cromosomas homólogos de cada bivalente están conectados a las fibras del huso de los polos opuestos (**FIGURA 14-46*a***). Por el contrario, las cromátidas hermanas están conectadas con microtúbulos del mismo polo del huso, lo que es posible gracias a la disposición lado a lado de sus cinetocoros, como se ve en el dibujo de la figura 14-46*a*). La orientación de los cromosomas maternos y paternos de cada bivalente en la placa metafásica I es aleatoria, el miembro materno de un bivalente particular tiene la misma probabilidad de enfrentarse a cualquie-

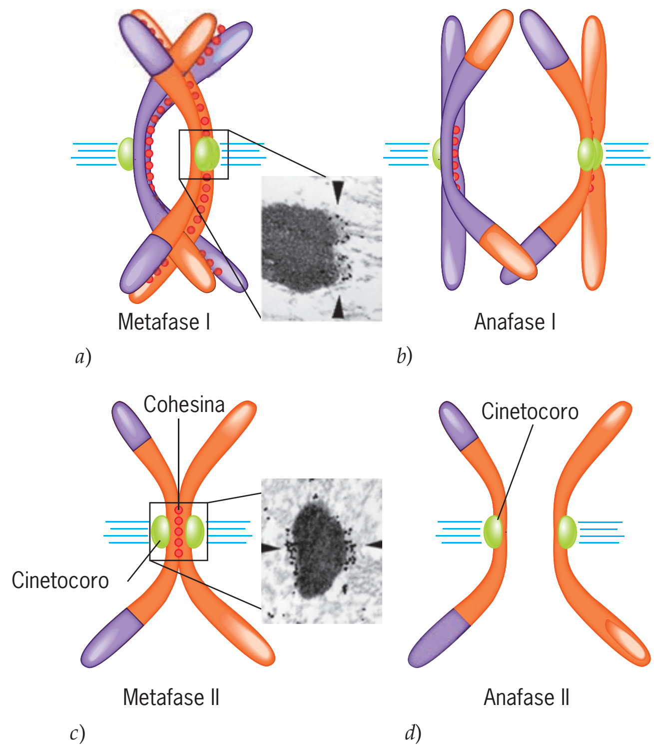



**FIGURA 14-46 Separación de cromosomas homólogos durante la meiosis I y separación de cromátidas durante la meiosis II.** *a*) Diagrama esquemático de un par de cromosomas homólogos en metafase I. Las cromátidas se mantienen juntas a lo largo de ambos brazos y centrómeros mediante cohesión. El par de homólogos se mantiene como bivalente por los quiasmas. La micrografía insertada muestra que los cinetocoros (puntas de flecha) de las cromátidas hermanas están situados en un lado del cromosoma, mirando hacia el mismo polo. Los puntos negros son partículas de oro unidas a la proteína de motor CENP-E de los cinetocoros (véase figura 14-16*c*). *b*) En la anafase I, la cohesina que sostiene los brazos de las cromátidas se divide, permitiendo que los homólogos se separen entre sí. La cohesina permanece en el centro, sosteniendo las cromátidas juntas. *c*) En la metafase II, las cromátidas se mantienen juntas en el centrómero, con microtúbulos de polos opuestos unidos a los dos cinetocoros. La micrografía empotrada muestra que los cinetocoros de las cromátidas hermanas están ahora en lados opuestos del cromosoma, enfrentando polos opuestos. *d*) En la anafase II, la cohesina que mantiene juntas las cromátidas se ha dividido, lo que permite que los cromosomas se muevan a polos opuestos.

FUENTE: Insets; Jibak Lee, *et al*. *Mol Reprod Develop* 2000;56:51. Reproducida con permiso de John Wiley & Sons.

ra de los polos. En consecuencia, cuando los cromosomas homólogos se separan durante la anafase I, cada polo recibe una colección aleatoria de cromosomas maternos y paternos (véase figura 14-39). Así la anafase I es el evento citológico que corresponde a la ley de Mendel de la variedad independiente (p. 368). Como resultado del surtido independiente, los organismos son capaces de generar una variedad de gametos casi ilimitada.

La separación de cromosomas homólogos en la anafase requiere la disolución de los quiasmas que mantiene juntos los bivalentes. Los quiasmas se mantienen por la cohesión entre cromátidas hermanas en las regiones que flanquean estos sitios de recombinación (figura 14-46*a*). Desaparecen en la transición metafase I-anafase I, ya que los brazos de las cromátidas de cada bivalente pierden cohesión (figura 14-46*b*), lo cual se logra mediante la división proteolítica de las moléculas de cohesina en esas regiones del cromosoma. En contraste, la cohesión entre los centrómeros unidos de las cromátidas hermanas permanece fuerte, porque la cohesina situada allí está protegida del ataque proteolítico (figura 14-46*b*). Como resultado, las cromátidas hermanas permanecen firmemente unidas entre sí a medida que se mueven juntas hacia un polo del huso durante la anafase I.

La telofase I de la meiosis I produce cambios menos drásticos que la telofase de la mitosis. Aunque los cromosomas suelen sufrir alguna dispersión, no alcanzan el estado muy extendido del núcleo de la interfase. La envoltura nuclear puede o no reformarse durante la telofase I. La etapa entre las dos divisiones meióticas se denomina *intercinesis* y por lo general es de corta vida. En animales las células en esta etapa fugaz se denominan *espermatocitos secundarios* u *ovocitos secundarios*. Estas células se caracterizan por ser haploides porque contienen solo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. A pesar de que son haploides, tienen el doble de DNA que un gameto haploide, pues cada cromosoma todavía está representado por un par de cromátidas adjuntas. Se dice que los espermatocitos secundarios tienen una cantidad 2C de DNA, la mitad que un espermatocito primario, que tiene un contenido de DNA 4C, y dos veces más que un espermatozoide, que tiene un contenido de DNA de 1C.

Tras la interquinesis se desarrolla la profase II, mucho más simple que su predecesora. Si la envoltura nuclear se había reformado en la telofase I, se descompone de nuevo. Los cromosomas se recompactan y se alinean en la placa metafásica. A diferencia de la metafase I, los cinetocoros de las cromátidas hermanas de la metafase II se enfrentan a los polos opuestos, y se unen a conjuntos opuestos de fibras fusiformes cromosómicas (figura 14-46*c*). La progresión de la meiosis en los vertebrados se detiene en la metafase II. La detención de la meiosis en la metafase II se produce por factores que inhiben la activación de la $APC^{Cdc20}$, impidiendo así la degradación de la ciclina B. Mientras los niveles de ciclina B permanezcan altos dentro del ovocito, la actividad de la Cdk se mantiene y las células no pueden progresar a la siguiente etapa meiótica. La detención de la metafase II se libera solo cuando el ovocito (en esa etapa llamado óvulo) se fecunda. La fertilización conduce a una afluencia rápida de iones $Ca^{2+}$, a la activación de la $APC^{Cdc20}$ (p. 562) y a la destrucción de la ciclina B. El óvulo fertilizado responde a estos cambios completando la segunda división meiótica. La anafase II comienza con la división sincrónica de los centrómeros que han mantenido unidas a las cromátidas hermanas, permitiéndoles moverse hacia los polos opuestos de la célula (figura 14-46*d*). La meiosis II termina con la telofase II, en la que los cromosomas se vuelven a encerrar por una envoltura nuclear. Los productos de la meiosis son células haploides con una cantidad 1C de DNA nuclear.

**REPASO**

1. Compare los eventos que tienen lugar durante la profase I y la profase II de la meiosis.

# 14.14 PERSPECTIVA HUMANA

## La no disyunción meiótica y sus consecuencias

La meiosis es un proceso complejo, y los errores meióticos en los seres humanos parecen ser sorprendentemente comunes. Los cromosomas homólogos pueden no separarse el uno del otro durante la meiosis I o las cromátidas hermanas pueden no separarse durante la meiosis II. Cuando ocurre cualquiera de estas situaciones se forman gametos que contienen un número anormal de cromosomas, ya sea un cromosoma extra o un cromosoma faltante (**FIGURA 1**). Si uno de estos gametos se fusiona con un gameto normal, se forma un cigoto con un número anormal de cromosomas y se producen serias consecuencias. En la mayoría de los casos, el cigoto se desarrolla en un embrión anormal que muere en algún momento entre la concepción y el nacimiento. Sin embargo, en algunos casos el cigoto se desarrolla en un bebé cuyas células tienen un número anormal de cromosomas, una condición conocida como *aneuploidía*. Las consecuencias de la aneuploidía dependen de qué cromosoma o cromosomas se vean afectados.

El complemento del cromosoma humano normal es 46: 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. Un cromosoma extra (que produce un total de 47 cromosomas) crea una condición conocida como *trisomía* (**FIGURA 2**). Una persona cuyas células contienen un cromosoma 21 adicional, por ejemplo, tiene trisomía 21. La pérdida de un cromosoma (que produce un total de 45 cromosomas) produce una *monosomía*. Comenzaremos considerando los efectos de un número anormal de autosomas.

La ausencia de un cromosoma autosómico, con independencia de qué cromosoma se vea afectado, invariablemente demuestra ser letal en algún momento durante el desarrollo embrionario o fetal. En consecuencia, un cigoto que contiene una monosomía autosómica no da lugar a un feto que se lleva a término. Aunque podría no esperarse que la posesión de un cromosoma adicional genere una afección potencialmente mortal, el hecho es que a las trisomías no les va mucho mejor que a los cigotos monosómicos. De los 22 autosomas diferentes en el complemento cromosómico humano, solo las personas con trisomía 21 pueden sobrevivir más allá de las primeras semanas o meses de vida. La mayoría de las otras trisomías posibles son letales durante el desarrollo, mientras que las trisomías para los cromosomas 13 y 18 a menudo nacen con vida, pero tienen anomalías tan graves que perecen poco después del nacimiento. Más de una cuarta parte de los fetos que las madres abortan espontáneamente tienen una trisomía cromosómica. Se cree que muchos cigotos más, con números anormales de cromosomas, producen embriones que mueren en una etapa temprana del desarrollo antes de que se reconozca el embarazo. Por ejemplo, por cada cigoto trisómico formado en la fertilización, presumiblemente hay un número igual de cigotos monosómicos que tienen

(*continúa*)

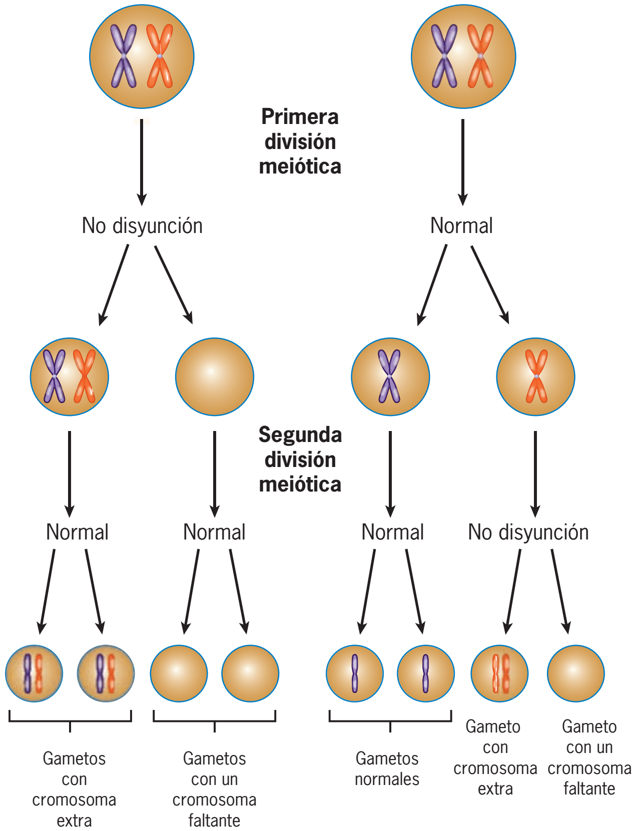



**FIGURA 1** La no disyunción meiótica ocurre cuando los cromosomas no se separan entre sí durante la meiosis. Si la falla en la separación ocurre durante la primera división meiótica, que se llama *no disyunción primaria*, todas las células haploides tienen un número anormal de cromosomas. Si no se produce la disyunción durante la segunda división meiótica, que se denomina no disyunción secundaria, solo se ven afectadas dos de las cuatro células haploides. (También pueden ocurrir tipos más complejos de no disyunción que los que se muestran aquí).

incluso menos éxito. Se estima que alrededor de 20 a 25% de los ovocitos humanos son aneuploides, lo que es mucho mayor que cualquier otra especie que se haya estudiado. La meiosis en los machos ocurre con un nivel mucho más bajo de anormalidades cromosómicas que en las hembras.

No toda la aneuploidía que ocurre durante el desarrollo humano necesariamente comienza con el cigoto. Un estudio reciente de embriones tempranos formados por fertilización *in vitro* (IVF, *in vitro fertilization*) encontró que *la mayoría* de estos embriones contenían algunas células (llamadas blastómeras) con un cariotipo aneuploide. Las células aneuploides estaban presentes junto a las células normales en el mismo embrión, lo que sugiere 1) que la no disyunción cromosómica ocurre con frecuencia durante las divisiones mitóticas de las células embrionarias tempranas y 2) que estas células anormales se destruyen de alguna manera durante el desarrollo temprano, debido al hecho de que los bebés nacidos como resultado de la fertilización *in vitro* no muestran un nivel anormalmente alto de anormalidades cromosómicas. Debido a que es imposible estudiar el complemento cromosómico de las células de embriones humanos concebidos *in vivo*, no sabemos si la ocurrencia de la ausencia de distensión mitótica observada en este estudio es un fenómeno restringido a los embriones generados por la IVF.

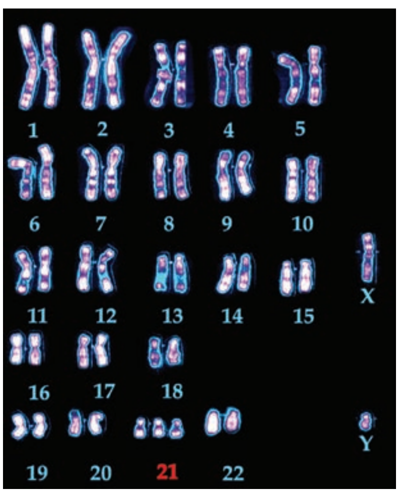



**FIGURA 2** El cariotipo de una persona con síndrome de Down. El cariotipo muestra un cromosoma 21 adicional (trisomía 21).
FUENTE: PHANIE/Photo Researchers, Inc.

Aunque el cromosoma 21 es el más pequeño con menos de 400 genes, la presencia de una copia extra de este material genético conduce al *síndrome de Down*. Las personas con este síndrome exhiben grados variables de deterioro mental, alteración en ciertas características del cuerpo, problemas circulatorios, mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, un riesgo mucho mayor de desarrollar leucemia y la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer. Se cree que todos estos problemas médicos son el resultado de un nivel de expresión más alto que el normal en genes ubicados en el cromosoma 21. Además, la expresión de los genes en otros cromosomas también se puede ver afectada por los niveles excesivos de ciertos factores de transcripción codificados por genes en el cromosoma 21.

La presencia de un número anormal de cromosomas sexuales es mucho menos perjudicial para el desarrollo humano. Un cigoto con solo un cromosoma X y sin segundo cromosoma sexual (designado como XO) se desarrolla en una mujer con *síndrome de Turner*, en el cual el desarrollo genital se detiene en el estado juvenil, los ovarios fracasan en desarrollarse y la estructura del cuerpo es ligeramente anormal. Como el cromosoma Y es determinante masculino, las personas con al menos un cromosoma Y se desarrollan como hombres. Un hombre con un cromosoma X adicional (XXY) desarrolla el *síndrome de Klinefelter*, que se caracteriza por retraso mental, subdesarrollo de los genitales y la presencia de características físicas femeninas (como aumento de los senos). Un cigoto con un Y extra (XYY) se convierte en un varón físicamente normal, que quizás sea más alto que el promedio. Una controversia considerable se desarrolló en torno a afirmaciones de que los varones XYY tienden a exhibir un comportamiento más agresivo, antisocial y criminal que el de los varones XY, pero esta hipótesis nunca se ha corroborado.

La probabilidad de tener un hijo con síndrome de Down aumenta drásticamente con la edad de la madre: de 0.05% para madres de 19 años a más de 3% para las mujeres mayores de 45. La mayoría de las investigaciones muestran que no se encontró tal correlación entre la edad del padre y la probabilidad de tener un hijo con trisomía 21. Las estimaciones basadas en las comparaciones de las secuencias de DNA entre la descendencia y los padres indican que casi 95% de las trisomías 21 se puede remontar a la ausencia de disyunción en la madre. Sin embargo, es de notar que aunque la ausencia de disociación cromosómica no parece aumentar durante la espermatogénesis en relación con la edad del padre, el número de nuevas mutaciones que el padre hereda a un niño aparentemente aumenta a medida que el hombre envejece. Este fenómeno está relacionado con un aumento aparente en el riesgo de autismo en niños nacidos de padres mayores.

Antes se ha señalado que un número anormal de cromosomas puede ser el resultado de la ausencia de disyunción en cualquiera de las dos divisiones meióticas (figura 1). Aunque estos diferentes eventos de no disyunción producen el mismo efecto en términos del número de cromosomas en el cigoto, se pueden distinguir por análisis genético. La no disyunción primaria transmite dos cromosomas homólogos al cigoto, mientras que la no disyunción secundaria transmite dos cromátidas hermanas al

cigoto (muy alteradas tal vez por el intercambio de segmentos cromosómicos). Los estudios indican que la mayoría de los errores ocurren durante la meiosis I. Por ejemplo, en un estudio de 433 casos de trisomía 21 que resultó de la no disyunción materna, 373 fueron el resultado de errores que ocurrieron durante la meiosis I y 60 fueron el resultado de errores durante la meiosis II.

¿Por qué la meiosis I debería ser más susceptible a la no disyunción que a la meiosis II? No conocemos la respuesta precisa a esa pregunta, pero casi con certeza refleja el hecho de que los ovocitos de mujeres mayores han permanecido detenidos en la meiosis I durante un periodo muy largo dentro del ovario. Se observó en el capítulo que los quiasmas —que son indicadores visuales de la recombinación genética— desempeñan un papel importante al mantener junto un bivalente durante la metafase I. Según una hipótesis, los husos meióticos de los ovocitos más viejos son menos capaces de mantener bivalentes débilmente construidos (p. ej., bivalentes con solo un quiasma localizado cerca de la punta del cromosoma) que los ovocitos más jóvenes, aumentando la probabilidad de que los cromosomas homólogos se segreguen de modo incorrecto en la anafase I. Otra posibilidad es que la cohesión de la cromátida hermana —que evita que los quiasmas se "deslicen" del extremo del cromosoma— no se mantenga totalmente durante un periodo prolongado, permitiendo a los homólogos separarse de forma prematura.

## 14.15 Recombinación genética durante la meiosis

Además de reducir el número de cromosomas según lo requerido para la reproducción sexual, la meiosis aumenta la variabilidad genética en una población de organismos de una generación a otra. La distribución independiente permite que los cromosomas maternos y paternos se mezclen durante la formación de los gametos, y la recombinación genética (intercambio de segmentos cromosómicos) permite que los alelos maternos y paternos en un cromosoma determinado también se mezclen (véase figura 14-39). Sin recombinación genética, los alelos a lo largo de un cromosoma particular permanecerían unidos generación tras generación. Al mezclar alelos maternos y paternos entre cromosomas homólogos, la meiosis genera organismos con genotipos y fenotipos novedosos sobre los que la selección natural puede actuar (véase figura 10-7 para un ejemplo de la mosca de la fruta). En humanos se ha estimado que existen alrededor de 25 eventos de recombinación en cualquier espermatozoide dado.

La recombinación involucra la rotura física de moléculas de DNA individuales, y el enlace de los extremos partidos de un DNA dúplex con los extremos partidos del dúplex del cromosoma homólogo. La recombinación es un proceso notablemente preciso, que normalmente ocurre sin la adición o pérdida de un solo par de bases. Para que ocurra con tanta fidelidad, la recombinación depende de las secuencias de bases complementarias que existen entre una sola hebra de un cromosoma, y la hebra homóloga de otro cromosoma, como se discute a continuación. La precisión de la recombinación se asegura aún más por la participación de las enzimas de reparación del DNA, que llenan los gaps que se desarrollan durante el proceso de intercambio.

En la **FIGURA 14-47** se muestra un modelo simplificado de los pasos propuestos que ocurren durante la recombinación en células eucariotas. En este modelo dos dúplex de DNA, que están a punto de recombinarse, se alinean uno al lado del otro como resultado de algún tipo de *búsqueda de homología*, donde moléculas de DNA homólogas se asocian entre sí en preparación para la recombinación. Una vez que están alineadas, una enzima (Spo11) introduce una ruptura en la hebra doble en una de las dobles hélices de DNA (paso 1, figura 14-47). En consecuencia el gap se ensancha (resecciona), como se indica en el paso 2. La resección puede ocurrir por acción de una exonucleasa 5′→ 3′ o mediante un mecanismo alternativo. A pesar de todo, las hebras rotas tienen colas de una sola hebra expuestas, cada una con una terminación 3′ OH. En el modelo que se muestra en la figura 14-47, una de las colas de cadena simple sale de su propia molécula de doble hélice e invade la molécula de DNA de una cromátida no hermana, uniéndose por enlace de hidrógeno con la cadena complementaria en la molécula de doble hélice vecina (paso 3). En la *E. coli*, este proceso en el que una sola hebra invade una molécula doble intacta y desplaza la hebra correspondiente en esa molécula doble, es catalizado por una enzima recombinasa, llamada *proteína RecA*. La RecA recombinasa se polimeriza a lo largo del DNA de cadena sencilla, formando un filamento de nucleoproteína. La RecA posibilita que el DNA de hebra simple busque e invada una doble hélice homóloga. Las células eucariotas tienen homólogos de la RecA (p. ej., la Rad51) que se piensa catalicen la invasión de hebras. La invasión de hebras acciona una actividad de reparación del DNA (sección 13.8) que llena los gaps, como se muestra en el paso 4.

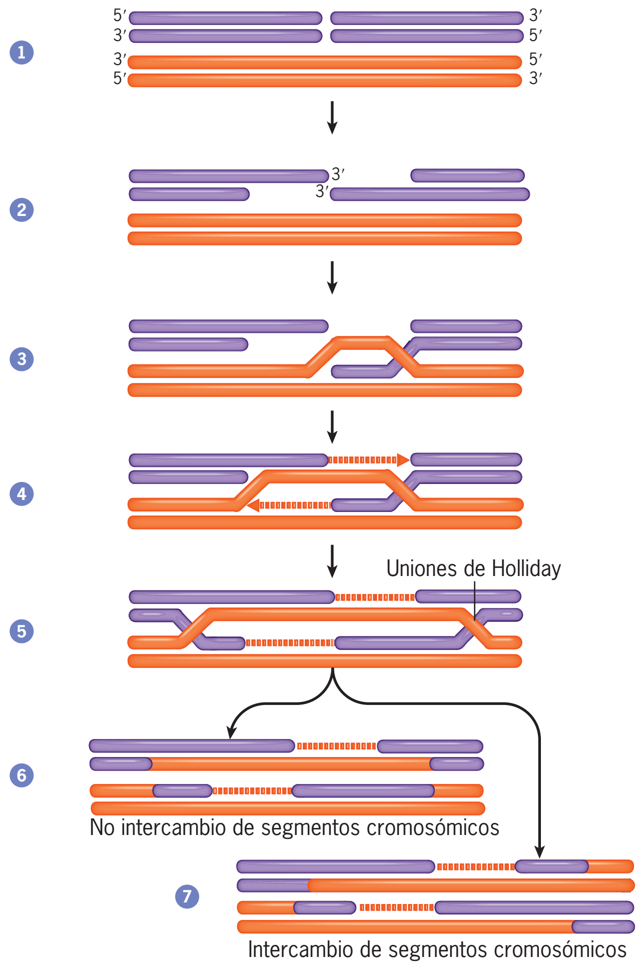



**FIGURA 14-47 Un mecanismo propuesto para la recombinación genética iniciado por las roturas de doble hebra.** Los pasos se describen en el texto.

Como resultado del intercambio recíproco de cadenas de DNA, los dos dúplex están unidos de forma covalente entre sí para formar una molécula conjunta (o *heterodúplex*) que contiene

un par de sitios de intercambio de segmentos cromosómicos de DNA, o *uniones de Holliday*, que flanquean la región de intercambio de hebras (pasos 4 y 5, figura 14-47). Estas uniones se nombran así en honor a Robin Holliday, quien propuso su existencia en 1964. Este tipo de intermediario de recombinación no necesita ser una estructura estática porque el punto de enlace se puede mover en una dirección u otra (un evento conocido como *migración de rama*) rompiendo los enlaces de hidrógeno que sostienen pares originales de hebras y reformando los enlaces de hidrógeno entre las hebras de doble hélice recién unidos (paso 5). La formación de las uniones de Holliday y la migración de ramificaciones ocurren durante el paquiteno (figura 14-42). Para dividir en sus partes constituyentes las moléculas de DNA interconectadas en las uniones de Holliday y restablecer de nuevo el DNA en dos hebras de doble hélice, se debe producir otra ronda de corte del DNA. En dependencia de las hebras de DNA particulares que se dividen y se ligan, se pueden generar dos productos alternativos. En un caso las dos dobles contienen solo fragmentos cortos de intercambio genético, lo que representa una falta de entrecruzamiento (paso 6, figura 14-47). En la ruta alternativa de ruptura y ligadura, la doble hélice de una molécula de DNA se une de forma covalente la doble hélice de la molécula homóloga, creando un sitio de recombinación genética (es decir, un entrecruzamiento) (paso 7). Se piensa que la decisión de si la interacción recombinatoria dará lugar o no a un entrecruzamiento se produce mucho antes de la etapa en la que la unión de Holliday doble realmente se separa en sus partes constituyentes. Los entrecruzamientos, que representan la fusión de un cromosoma materno y paterno (paso 7), se desarrollan en los quiasmas requeridos para mantener juntos los homólogos durante la meiosis I (figura 14-44). En los mamíferos la cantidad de no entrecruzamientos supera en gran medida a la cantidad de entrecruzamientos. Además, como se observa en la página 402, se producen entrecruzamientos en ciertas regiones del genoma ("puntos calientes" de recombinación) con una frecuencia mucho más alta que en otras regiones. Se predice que estos puntos calientes de recombinación son sitios de enlace para una proteína llamada PRDM9, que luego dirige la recombinación mediante un mecanismo que aún no se conoce bien.



**REPASO**

1. ¿Cuál es el papel de las roturas del DNA en la recombinación genética?

# Preguntas analíticas

1. ¿De qué manera la división celular es un vínculo entre los humanos y las primeras células eucarióticas?
2. ¿Qué tipos de eventos de síntesis esperaría que ocurrieran en $G_1$ que no ocurren en $G_2$?
3. Suponga que está marcando una población de células que crece de forma asincrónica con [$^3$H]timidina. $G_1$ dura 6 horas, S dura 6 horas, $G_2$ dura 5 horas, y M 1 hora. ¿Qué porcentaje de las células se marcarían después de un pulso de 15 minutos? ¿Qué porcentaje de células mitóticas se marcaría después de dicho pulso? ¿Cuánto tiempo tendría que rastrear estas células antes de ver algún cromosoma mitótico marcado? ¿Qué porcentaje de las células habrían marcado cromosomas mitóticos si usted rastreó las células durante 18 horas? (Véase **"Video tutorial cuantitativo"**).
4. Suponga que toma un cultivo de las mismas células utilizadas en la pregunta anterior, pero en lugar de etiquetarlas por impulsos con [$^3$H]timidina, las etiqueta continuamente durante 20 horas. Trace un gráfico que muestre la cantidad de DNA radiactivo que estaría presente en el cultivo durante el periodo de 20 horas. ¿Cuál sería la cantidad mínima de tiempo necesaria para garantizar que todas las células tengan alguna marca incorporada? ¿Cómo podría determinar la duración del ciclo celular en este cultivo sin el uso de una marca radiactiva?
5. La fusión de células de las fases $G_1$ y S produce resultados distintos de fusionar una célula de la fase $G_2$ con una de la S. ¿Cuál esperaría usted que fuera esta diferencia y cómo puede explicarla? (*Sugerencia*: Mire hacia atrás en la figura 13-20, que muestra que el inicio de la replicación requiere la formación de un complejo de prerreplicación, que solo se puede formar en $G_1$).
6. La figura 14-6 muestra el efecto sobre el ciclo celular de las mutaciones en los genes que codifican la Wee1 y la Cdc25. La cinasa CAK se identificó bioquímicamente y no genéticamente (es decir, mediante aislamiento de células mutantes). ¿Qué fenotipo esperaría usted en una célula de levadura que transportara una mutación de CAK sensible a la temperatura, después de aumentar la temperatura del medio de cultivo en la $G_1$ temprana? ¿A finales de la $G_2$? ¿Qué podría ser diferente en dependencia de la etapa en que se elevó la temperatura?
7. Proporcione cuatro mecanismos distintos mediante los cuales se pueda activar un Cdk.
8. Un sincitio es una "célula" que contiene más de un núcleo, como por ejemplo una fibra de músculo esquelético y una blástula de un embrión de mosca. Estos dos tipos de sincitios surgen por caminos muy diferentes. ¿Qué dos mecanismos puede imaginar que podrían llevar a la formación de sincitios? ¿Qué le dice esto sobre la relación entre la mitosis y la citocinesis?
9. ¿Cómo podría determinar experimentalmente si los microtúbulos de los microtúbulos polares estaban en un estado de flujo dinámico durante la fase anafásica? Conociendo los eventos que ocurren en esta etapa, ¿qué esperaría ver?
10. Si tuviera que agregar [$^3$H]timidina a una célula a medida que fuera sometida a la replicación (fase S) antes de comenzar la meiosis, ¿qué porcentaje de los cromosomas de los gametos producidos se marcarían? Si uno de estos gametos (un espermatozoide) fuera a fertilizar un huevo no marcado, ¿qué porcentaje de los cromosomas de la etapa de dos células se marcarían?
11. Si el número haploide de cromosomas en humanos es 23 y la cantidad de DNA nuclear en un espermatozoide es 1C, ¿cuántos cromosomas posee una célula humana en las siguientes etapas: metafase de mitosis, profase I de meiosis, anafase I de meiosis I, profase II de la meiosis, anafase II de la meiosis? ¿Cuántas cromátidas tiene la célula en cada una de estas etapas? ¿Cuánto DNA (en términos de números de C) tiene la célula en cada una de estas etapas?
12. Haga un gráfico de la cantidad de DNA en el núcleo de una espermatogonia desde la etapa $G_1$ antes de la primera división meiótica hasta completar la meiosis. Marque cada una de las etapas principales del ciclo celular y de la meiosis en el gráfico.
13. ¿Cuántos centríolos tiene una célula en metafase de mitosis?
14. Suponga que le dijeron que la mayoría de los casos de trisomía provocan la formación de un óvulo en el oviducto mientras espera la fertilización. ¿Qué tipo de evidencia podría obtener al examinar fetos abortados espontáneamente que confirmaran esta sugerencia? ¿Cómo encajaría esto con los datos ya recopilados?
15. Supongamos que se incuba una célula meiótica en [$^3$H]timidina entre las etapas de leptoteno y cigoteno, y luego fija la célula

durante el paquiteno y prepara una autorradiografía. Se encuentra que los quiasmas son sitios de concentración de granos de plata. ¿Qué le dice esto sobre el mecanismo de recombinación?

16. ¿Qué tipo de fenotipo esperaría de una célula cuyo polipéptido Cdc20 fuera mutado de modo que 1) no fuera capaz de unirse a la Mad2, 2) no se pudiera unir a las otras subunidades del APC, o 3) fallara en disociarse del APC al final de la fase?
17. Supongamos por un momento que el intercambio de segmentos cromosómicos no ocurrió. ¿Estaría de acuerdo en que recibió la mitad de sus cromosomas de cada padre? ¿Estaría de acuerdo en que recibió una cuarta parte de sus cromosomas de cada abuelo? ¿Cambiarían las respuestas a estas preguntas si permitiera que se produjera el cruce?
18. Los fetos cuyas células son triploides, es decir, contienen tres conjuntos completos de cromosomas, se desarrollan a término y mueren cuando son bebés, mientras que los fetos con trisomías cromosómicas individuales tienden a no funcionar bien. ¿Cómo puede explicar esta observación?
19. ¿Qué tipo de fenotipo esperaría de una célula de levadura con fisión cuya subunidad Cdk careciera de cada uno de los siguientes residuos como resultado de la mutación: Tyr 15, Thr 161?
20. Como se observó en la página 549, la duplicación del centrosoma y la síntesis del DNA son iniciadas por la ciclina E-Cdk2, que se vuelve activa al final de la $G_1$. Un estudio reciente descubrió que si la ciclina E-Cdk2 se activaba en una etapa anterior, como el comienzo de la $G_1$, esa duplicación del centro comienza en ese punto en el ciclo celular, pero la replicación del DNA no se inicia hasta que la fase S comience normalmente. Proporcione una hipótesis para explicar por qué la síntesis de DNA no comienza también. Puede consultar la figura 13-20 para obtener más información.

CAPÍTULO

# 15 Señalización celular y transducción de señal: comunicación entre células



El calamar bobtail hawaiano mantiene una relación simbiótica con bacterias de percepción de quórum. Cuando está presente en altas concentraciones, la bacteria *Vibrio fischeri* produce luz que le permite al calamar cazar presas sin proyectar una sombra.

FUENTE: MATTHIASORMESTAD.

## PERCEPCIÓN DE QUÓRUM

En la caza en aguas costeras poco profundas del océano Pacífico, el calamar bobtail hawaiano usa una táctica inteligente para asustar a presas potenciales. Mientras flota sobre el fondo oceánico en las noches de luna, el calamar produce un brillo de forma que su silueta se oscurece cuando es visto desde abajo. La luz producida por el calamar bobtail es una forma de bioluminiscencia, donde la luz se produce y se emite por un organismo vivo. El brillo azulado del bobtail de Hawái se produce en realidad por bacterias simbióticas, *Aliivibrio fischeri*, que son capturadas y mantenidas en un órgano de luz altamente especializado en el manto del calamar. Curiosamente, la *A. fischeri* sólo es fluorescente en condiciones de aglomeración, como en el órgano de luz del calamar. Cuando se dispersan ampliamente, las bacterias cesan de producir luz.

La fluorescencia de la *A. fischeri* es un ejemplo del comportamiento conocido como percepción de quórum, en el que los organismos unicelulares se comunican entre sí usando mensajes químicos. Años después de que este fenómeno se descubrió por primera vez, se pensaba que la percepción de quórum sólo ocurría en casos raros, aislados. Sin embargo, en

(*continúa*)

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


- 15.1 Los elementos básicos de los sistemas de señalización celular
- 15.2 Un estudio de mensajeros extracelulares y sus receptores
- 15.3 Transducción de señal por receptores acoplados a proteína G
- 15.4 **VÍAS EXPERIMENTALES:** El descubrimiento y la caracterización de las proteínas de unión a GTP
- 15.5 **PERSPECTIVA HUMANA:** Trastornos asociados con receptores acoplados a proteína G
- 15.6 Segundos mensajeros
- 15.7 La especificidad de las respuestas acopladas a proteína G
- 15.8 Regulación de los niveles de glucosa en sangre
- 15.9 La función de los GPCR en la percepción sensorial
- 15.10 Fosforilación de proteína-tirosina como un mecanismo para la transducción de señal
- 15.11 La vía de la cinasa Ras-MAP
- 15.12 Señalización por el receptor de insulina
- 15.13 Vías de señalización en las plantas
- 15.14 La función del calcio como un mensajero intracelular
- 15.15 Convergencia, divergencia y comunicación cruzada entre diferentes vías de señalización
- 15.16 La función del NO como mensajero intracelular
- 15.17 Apoptosis (muerte celular programada)

los últimos años, numerosos estudios han demostrado que casi todas las bacterias parecen producir y liberar moléculas de señalización con el fin de coordinar una variedad de actividades dentro y a través de las especies. La secreción de factores de virulencia, la formación y mantenimiento de biopelículas, la fluorescencia, e incluso la muerte celular programada son todos comportamientos que pueden ser activados por una lista cada vez mayor de moléculas de señalización bacterianas.

Los mecanismos por los cuales ocurre la señalización varían ampliamente entre las especies. Las bacterias grampositivas, por ejemplo, segregan moléculas de señalización que generalmente son cortas, péptidos modificados. Cuando se encuentran en altas concentraciones, estos péptidos pueden unirse a receptores afines en la superficie celular de otra bacteria, activando una vía de señalización que conduce a la transcripción de genes y a la producción de proteínas que alteran el comportamiento de la bacteria. Por el contrario, las bacterias gramnegativas sintetizan y liberan moléculas de señalización en forma de pequeñas moléculas. Estas moléculas son capaces de difundirse libremente a través de la membrana y unirse de modo directo a factores de transcripción citoplásmicos. La *A. fischeri*, que es un bacteria gramnegativa, produce una pequeña molécula llamada N-acil homoserina lactona (AHL, *N-acyl homoserine lactone*), que se libera en el ambiente. A densidades de células suficientemente altas, la AHL se une a un factor de transcripción, que finalmente conduce a la producción de genes de luminiscencia y a la producción de luz.

## 15.1 Los elementos básicos de los sistemas de señalización celular

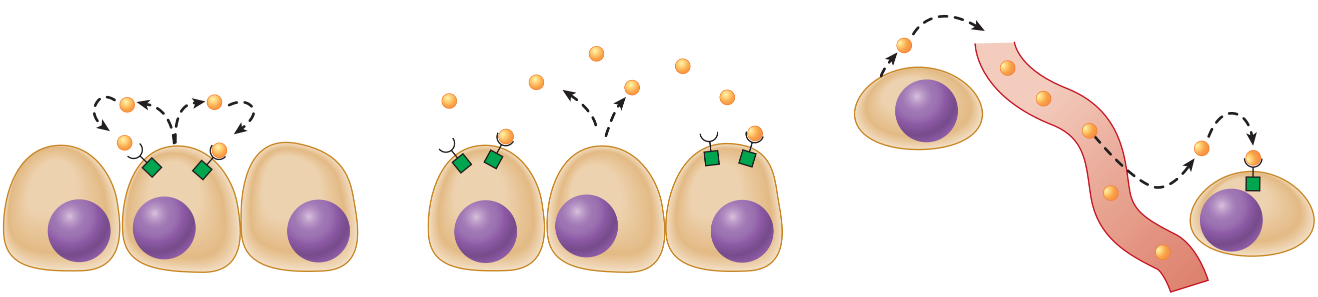
El poeta inglés John Donne expresó su creencia en la interdependencia de los humanos en la frase "Ningún hombre es una isla". Lo mismo se puede decir de las células que constituyen un organismo multicelular complejo. La mayoría de las células en una planta o animal están especializadas para realizar una o más funciones específicas. Muchos procesos biológicos requieren que varias células trabajen juntas y coordinen sus actividades. Para hacer esto posible, las células tienen que comunicarse entre sí, lo cual se realiza por un proceso llamado **señalización celular**, el que hace posible que las células respondan de manera apropiada a un estímulo ambiental específico.

La señalización celular afecta prácticamente todos los aspectos de la estructura y función celular, que es una de las principales razones por las que este capítulo aparece cerca del final del libro. Por un lado, una comprensión de la señalización celular requiere conocimiento sobre otros tipos de actividades celulares. Por otro lado, los conocimientos sobre la señalización celular pueden vincular una variedad de procesos celulares aparentemente independientes. La señalización celular está también involucrada de modo íntimo en la regulación del crecimiento y la división celular. Esto hace que el estudio de la señalización celular sea de crucial importancia para la comprensión de cómo una célula puede perder la capacidad de controlar la división celular y convertirse en un tumor maligno.

Puede ser útil comenzar la discusión de este complejo tema describiendo algunas de las características generales que comparten la mayoría de las vías de señalización. Las células generalmente se comunican entre sí a través de **moléculas mensajeras extracelulares**. Los mensajeros extracelulares pueden viajar una distancia corta y estimular las células que están muy cerca del origen del mensaje, o pueden viajar a través de todo el cuerpo, estimulando potencialmente células que están muy lejos de la fuente. En el caso de la señalización *autocrina*, la célula que está produciendo el mensajero expresa receptores en su superficie que pueden responder a ese mensajero (**FIGURA 15-1*a***). En consecuencia, las células que liberan el mensajero se estimularán (o inhibirán) a ellas mismas. Durante la señalización *paracrina* (figura 15-1*b*), las moléculas mensajeras viajan sólo distancias cortas a través del espacio extracelular a las células que están muy cerca de la célula que está generando el mensajero. Las moléculas mensajeras paracrinas por lo regular tienen una capacidad limitada para viajar alrededor del cuerpo porque son inherentemente inestables, o son degradadas por enzimas, o se unen a la matriz extracelular.

Finalmente, durante la señalización *endocrina*, las moléculas mensajeras alcanzan su células blanco a través del paso por el torrente sanguíneo (figura 15-1*c*). Los mensajeros endocrinos también se llaman *hormonas*, y generalmente actúan sobre las células blanco ubicadas en sitios distantes en el cuerpo.

Una visión general de las vías de señalización celular se describe en la **FIGURA 15-2**. La señalización celular se inicia con la liberación de una molécula mensajera por una célula que se dedica a enviar mensajes a otras células en el cuerpo (paso 1, figura 15-2). Los ambientes extracelulares de las células contienen cientos de diferentes moléculas de información, que varían desde compuestos pequeños (p. ej., esteroides y neurotransmisores) a pequeñas hormonas proteicas solubles (p. ej., glucagón e insulina), a grandes glucoproteínas unidas a las superficies de otras células. Las células sólo pueden responder a un mensaje extracelular particular si expresan **receptores** que reconocen específicamente y unen esa molécula mensajera (paso 2).



*a*) *b*) *c*)

**FIGURA 15-1 Tipos de señalización intracelular *a*) autocrina, *b*) paracrina y *c*) endocrina.**

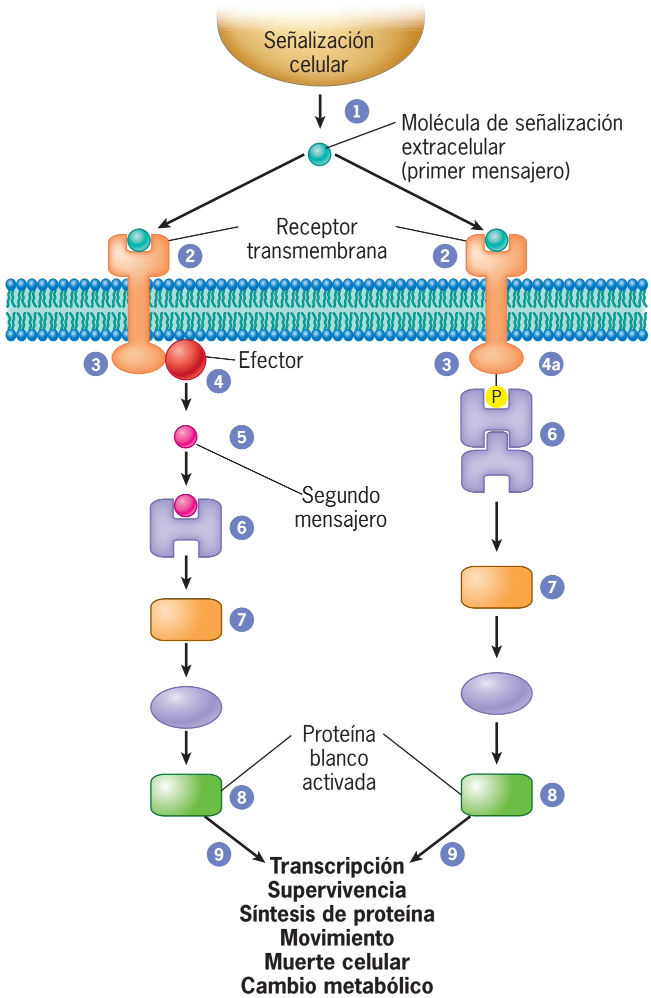



**FIGURA 15-2 Una visión general de las principales vías de señalización mediante las cuales las moléculas mensajeras extracelulares pueden inducir respuestas intracelulares.** Se representan dos tipos diferentes de vías de transducción de señales, una en la que la vía de señalización se activa mediante un segundo mensajero difusible y otra en la que una vía de señalización se activa mediante el reclutamiento de proteínas a la membrana plasmática. La mayoría de las vías de transducción de señales implican una combinación de estos mecanismos. También se debe tener en cuenta que las vías de señalización no son generalmente rutas lineales como se muestran aquí, sino que están ramificadas e interconectadas para formar una red compleja. Los pasos se describen en el texto.

La molécula que se une al receptor se llama **ligando**. Los distintos tipos de células poseen diferentes complementos de receptores que les permiten responder a diversos mensajeros extracelulares. Incluso las células que comparten un receptor específico pueden responder de manera muy diferente al mismo mensajero extracelular. Las células hepáticas y las células de los músculos lisos poseen el receptor adrenérgico $\beta_2$. La activación de este receptor al circular la adrenalina conduce a la descomposición del glucógeno en una célula hepática y a la relajación en una célula del músculo liso. Estos diferentes resultados que siguen a la interacción con el mismo estímulo inicial se pueden localizar en diferentes proteínas intracelulares que participan en la respuesta en estos dos tipos de células. Por tanto, los tipos de actividades en los que una célula participa dependen de los estímulos que recibe y de la maquinaria intracelular que posee en ese momento particular de su vida.

En la mayoría de los casos, la molécula mensajera extracelular se une a un receptor en la superficie externa de la célula que responde. Esta interacción induce un cambio conformacional en el receptor que causa que la señal sea retransmitida a través de la membrana hasta el dominio citoplásmico del receptor (paso 3, figura 15-2). Cuando ha alcanzado la superficie interna de la membrana plasmática, hay dos vías principales por las cuales la señal se transmite al interior de la célula, donde provoca la respuesta apropiada. La vía particular tomada depende del tipo de receptor que se active. La siguiente discusión se enfocará en estas dos vías principales de transducción de señales, pero teniendo en cuenta que hay otras formas en que las señales extracelulares pueden tener un impacto en una célula. Por ejemplo, se puntualizó en la sección 4.18 cómo actúan los neurotransmisores abriendo canales iónicos de la membrana plasmática y en la figura 12-47 cómo las hormonas esteroides se difunden a través de la membrana plasmática y se unen a receptores intracelulares. En las dos vías principales discutidas en este capítulo:

- Un tipo de receptor (sección 15.6) transmite una señal desde su dominio citoplásmico a una enzima cercana (paso 4), que genera un **segundo mensajero** (paso 5). Debido a que provoca (efectúa) la respuesta celular mediante la generación de un segundo mensajero, la enzima responsable se conoce como un **efector**. Los segundos mensajeros son pequeñas sustancias que normalmente activan (o inactivan) proteínas específicas. Dependiendo de su estructura química, un segundo mensajero puede difundirse a través del citosol o permanecer incrustado en la bicapa lipídica de una membrana.
- Otro tipo de receptor (sección 15.10) transmite una señal transformando su dominio citoplásmico en una estación de reclutamiento para proteínas de señalización celular (paso 4a). Las proteínas interactúan entre sí, o con componentes de una membrana celular, por medio de tipos específicos de dominios de interacción, como el dominio SH3 discutido en la página 606.

Si la señal se transmite por un segundo mensajero o por reclutamiento de proteínas, el resultado es similar; una proteína que está posicionada en la parte superior de una **vía de señalización** intracelular se activa (paso 6, figura 15-2). Las vías de señalización son las autopistas de la información de la célula. Cada vía de señalización consiste en una serie de proteínas distintas que operan en secuencia (paso 7). La mayoría de las "proteínas de señalización" están construidas de múltiples dominios, lo que les permite interactuar de una manera dinámica con una serie de socios diferentes, ya sea simultánea o secuencialmente. Este tipo de construcción *modular* se ilustra por las proteínas Grb2 e IRS-1 representadas en las figuras 15-20 y 15-24, respectivamente. A diferencia de Grb2 e IRS-1, que funcionan exclusivamente en la mediación de las interacciones proteína-proteína, muchas proteínas de señalización también contienen dominios catalíticos y/o reguladores que les dan una función más activa en una vía de señalización.

Cada proteína en una vía de señalización actúa generalmente alterando la conformación de la proteína posterior (o corriente abajo) en las series, un evento que activa o inhibe esa proteína (**FIGURA 15-3**).No debería sorprender que después de leer sobre otros temas en biología celular, las alteraciones en la conformación de las proteínas de señalización a menudo se lleven a cabo por proteínas cinasas y proteínas fosfatasas que, respectivamente, agregan o eliminan grupos fosfato de otras proteínas (figura 15-3). El genoma humano codifica más de 500 proteínas cinasas diferentes y aproximadamente 150 proteínas fosfatasas diferentes. Mientras que las proteínas cinasas normalmente funcionan como una subunidad única, muchas proteínas fosfatasas contienen una subunidad reguladora clave que determina la especificidad del sustrato. Como resultado, una sola subunidad catalítica de fosfatasa puede formar un huésped de diferentes enzimas que eliminan grupos fosfato de diferentes sustratos proteicos.

La mayoría de las proteínas cinasas transfieren grupos fosfato a residuos de serina o treonina de sus sustratos proteicos, pero un

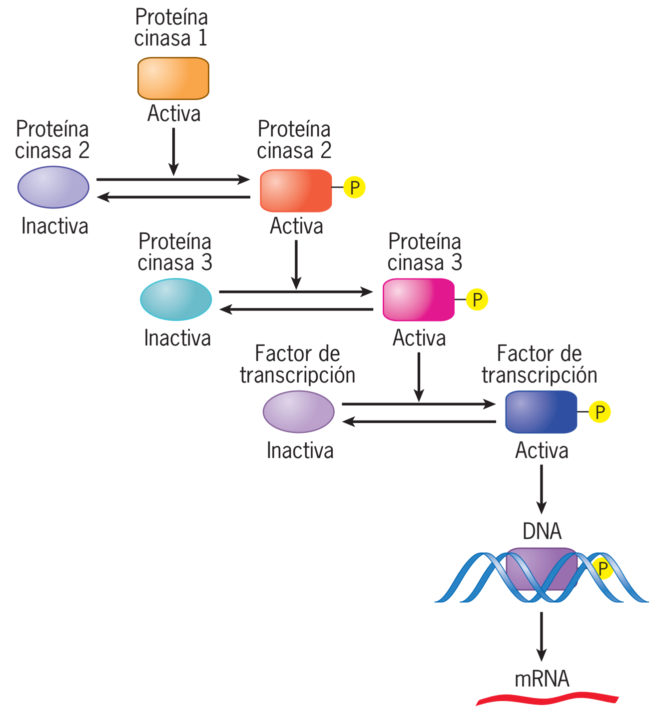



**FIGURA 15-3 Vía de transducción de señal que consiste en proteínas cinasas y proteínas fosfatasas cuyas acciones catalíticas cambian las conformaciones y, por tanto, las actividades de las proteínas que modifican.** En el ejemplo representado aquí, la proteína cinasa 2 se activa por la proteína cinasa 1. Una vez activada, la proteína cinasa 2 fosforila la proteína cinasa 3, activando la enzima. La proteína cinasa 3 luego fosforila un factor de transcripción, incrementando su afinidad por un sitio en el DNA. La unión de un factor de transcripción al DNA afecta la transcripción del gen en cuestión. Cada uno de estos pasos de activación en la vía se revierte por una fosfatasa.

grupo muy importante de cinasas (aproximadamente 90 en humanos) fosforila residuos de tirosina. Algunas proteínas cinasas y fosfatasas son proteínas citoplásmicas solubles; otras son proteínas integrales de membrana. Muchas cinasas están presentes en la célula en un estado autoinhibido. Dependiendo de la cinasa particular, estas enzimas se pueden activar en la célula por modificación covalente o por interacciones con otras proteínas, moléculas pequeñas o lípidos de la membrana. Es notable que, aunque miles de proteínas en una célula contienen residuos de aminoácidos con el potencial de ser fosforiladas, cada proteína cinasa o fosfatasa es capaz de reconocer sólo sus sustratos específicos e ignorar todos los demás. Algunas proteínas cinasas y fosfatasas tienen numerosas proteínas como sus sustratos, mientras que otras fosforilan o desfosforilan sólo un único residuo de aminoácido de un único sustrato proteico. Muchos de los sustratos proteicos de estas enzimas son enzimas en sí mismas —con frecuencia otras cinasas y fosfatasas—, pero los sustratos también incluyen canales iónicos, factores de transcripción y diversos tipos de proteínas reguladoras. Se cree que al menos la mitad de todas las proteínas transmembrana y citoplásmicas se fosforila en uno o más sitios. La fosforilación de proteínas puede cambiar el comportamiento de las proteínas de diferentes maneras. La fosforilación puede activar o inactivar una enzima, puede aumentar o disminuir las interacciones proteína-proteína, puede inducir que una proteína se mueva de un compartimiento subcelular a otro, o puede actuar como una señal que inicia la degradación de la proteína. Se han empleado enfoques proteómicos a gran escala (sección 2.15) para identificar los sustratos de varias proteínas cinasas y los residuos específicos que se fosforilan en diversos tejidos. Los estudios sobre proteomas de vertebrados han identificado más de 20 000 fosfoproteínas que acogen más de 200 000 sitios de fosforilación. La ocurrencia extendida de la fosforilación de proteínas y su supuesta importancia se observan en la **FIGURA 15-4**, que muestra la marcada diferencia en la frecuencia de fosforilación de la tirosina en ciertas proteínas de dos tipos diferentes de células cancerosas. El desafío principal es comprender las funciones de estas diversas modificaciones postraduccionales en las actividades de diferentes tipos de células.

Las señales transmitidas a lo largo de tales vías de señalización finalmente alcanzan las *proteínas blanco* (paso 8, figura 15-2) involucradas en los procesos de las células básicas (paso 9).

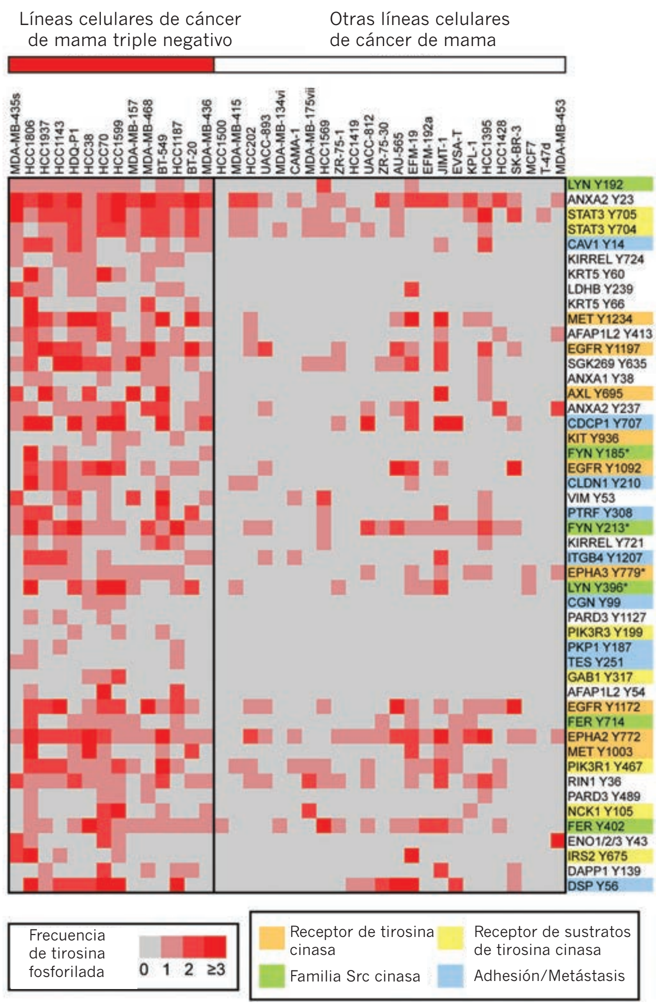



**FIGURA 15-4 Una comparación en la frecuencia de fosforilación de tirosina en dos tipos diferentes de células de cáncer de mama.** Los paneles en el lado izquierdo de la figura muestran la frecuencia de residuos de fosfotirosina (pTyr, *phosphotyrosine*) en ciertas proteínas (nombradas en el lado derecho de la figura) en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Las células triple negativas no expresan tres firmas moleculares principales de muchas células de cáncer de mama: el receptor de estrógeno de la célula, el receptor de progesterona y el receptor del factor de crecimiento HER2. La frecuencia de residuos de pTyr en células de cáncer de mama que expresan estas tres firmas de proteínas se muestra en los paneles de la derecha. La frecuencia de los residuos de pTyr en una determinada proteína en una línea celular determinada se indica mediante la intensidad del sombreado rojo del cuadro (véase la clave en la parte inferior de la figura). Los nombres de las líneas de células probadas se dan a lo largo de la parte superior de la figura. Es evidente que las células triple negativas tienen un nivel mucho mayor de fosforilación de tirosina que las otras células de cáncer de mama. Esto puede correlacionarse con la pérdida de la actividad particular de la proteína tirosina fosfatasa (PTPN12, *protein tyrosine phosphatase*) en muchos de los cánceres triples negativos.

FUENTE: Tomado de JG Albeck y JS Brugge, a partir de los datos de Ting-Lei Gu de Cell Signaling Technology. *Cell* 2011;144:639. Reimpreso con permiso de Elsevier.

Dependiendo del tipo de célula y mensaje, la respuesta iniciada por la proteína blanco puede implicar un cambio en la expresión del gen, una alteración de la actividad de las enzimas metabólicas, una reconfiguración del citoesqueleto, un aumento o disminución en la movilidad de la célula, un cambio en la permeabilidad iónica, la activación de la síntesis de DNA, o incluso la muerte de la célula. Prácticamente todas las actividades a las que se dedica una célula están reguladas por señales que se originan en su superficie. Este proceso general, en el que la información transportada por moléculas mensajeras extracelulares se traduce en cambios que ocurren dentro de una célula, es referido como **transducción de señal**.

Finalmente, la señalización debe ser terminada. Esto es importante porque las células tienen que responder a los mensajes adicionales que pueden recibir. El primer orden del día es eliminar la molécula mensajera extracelular. Para hacer esto, ciertas células producen enzimas extracelulares que destruyen mensajeros extracelulares específicos. En otros casos, los receptores activados se internalizan (sección 8.17). Una vez dentro de la célula, el receptor puede degradarse junto con su ligando, que puede abandonar la célula con una sensibilidad reducida a estímulos posteriores.

**REPASO**

1. ¿Qué se entiende por el término *transducción de señales*? ¿Cuáles son algunos de los pasos por los que puede ocurrir la transducción de señales?
2. ¿Qué es un segundo mensajero? ¿Por qué cree que se denomina así?

## 15.2 Un estudio de mensajeros extracelulares y sus receptores

Una gran variedad de moléculas puede funcionar como portadores extracelulares de información. Estas incluyen:

- Aminoácidos y derivados de aminoácidos. Los ejemplos incluyen glutamato, glicina, acetilcolina, epinefrina, dopamina y hormona tiroidea. Estas moléculas actúan como neurotransmisores y hormonas.
- Gases, como el NO y el CO.
- Esteroides, que se derivan del colesterol. Hormonas esteroides que regulan la diferenciación sexual, el embarazo, el metabolismo de los carbohidratos y la excreción de iones de sodio y potasio.
- Eicosanoides, que son moléculas no polares que contienen 20 carbonos que se derivan de un ácido graso llamado ácido araquidónico. Los eicosanoides regulan una variedad de procesos que incluyen dolor, inflamación, presión arterial y coagulación de la sangre. Varios medicamentos de venta libre que se usan para tratar cefaleas y la inflamación inhiben la síntesis de eicosanoides.
- Una amplia variedad de polipéptidos y proteínas. Algunos de estos están presentes como proteínas transmembrana en la superficie de una célula interactuante (sección 7.7). Otros son parte de, o están asociados con, la matriz extracelular. Finalmente, una gran cantidad de proteínas se excretan en el entorno extracelular donde están involucradas en la regulación de procesos como la división celular, la diferenciación, la respuesta inmunitaria, o la muerte celular y la supervivencia celular.

Las moléculas de señalización extracelular son generalmente, pero no siempre, reconocidas por los receptores específicos que están presentes en la superficie de la célula de respuesta. Como se ilustra en la figura 15-2, los receptores se unen a sus moléculas de señalización con alta afinidad y traducen esta interacción en la superficie externa de la célula en cambios que tienen lugar en el interior de la célula. Los receptores que han evolucionado para mediar la transducción de señal se indican a continuación.

- Los receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G protein-coupled receptors*) son una gran familia de receptores que contienen siete hélices alfa transmembrana. Estos receptores traducen la unión de las moléculas de señalización extracelular en la activación de proteínas de unión a GTP. Las **proteínas de unión a GTP** (o **proteínas G**) se discutieron en relación con el desprendimiento y fusión de vesículas en el capítulo 8, dinámica microtubular en el capítulo 9, síntesis de proteínas en los capítulos 8 y 11, y transporte nucleocitoplásmico en el capítulo 12. En el presente capítulo, se explorará su función en la transmisión de mensajes a lo largo de "circuitos de información celular".
- La proteína tirosina cinasa receptora (RTK, *receptor protein-tyrosine kinases*) representa una segunda clase de receptores que han evolucionado para traducir la presencia de moléculas mensajeras extracelulares en cambios dentro de la célula. La unión de un ligando extracelular específico a una RTK por lo general da como resultado la dimerización del receptor seguida de la activación del dominio del receptor de la proteína cinasa, que está presente dentro de su región citoplásmica. Tras la activación, estas proteínas cinasas fosforilan residuos de tirosina específicos de las proteínas citoplásmicas de sustrato, alterando así su actividad, su localización, o su capacidad de interactuar con otras proteínas dentro de la célula.
- Los canales activados por ligando representan una tercera clase de receptores de superficie celular que se unen a ligandos extracelulares. La habilidad de estas proteínas para conducir un flujo de iones a través de la membrana plasmática está regulada directamente por la unión del ligando. Un flujo de iones a través de la membrana puede dar como resultado un cambio temporal en el potencial de membrana, que afectará la actividad de otras proteínas de membrana, por ejemplo, canales activados por voltaje. Esta secuencia de eventos es la base para la formación de un impulso nervioso (sección 44.16). Además, la afluencia de ciertos iones, como $Ca^{2+}$, puede cambiar la actividad de determinadas enzimas citoplásmicas. Como se analiza en la sección 4.18, un gran grupo de canales activados por ligando funciona como receptores para los neurotransmisores.
- Los receptores de hormonas esteroides funcionan como factores de transcripción regulados por ligandos. Las hormonas esteroides se difunden a través de la membrana plasmática y se unen a sus receptores, que están presentes en el citoplasma. La unión de las hormonas produce un cambio conformacional que causa que el complejo hormona-receptor se mueva al núcleo y se una a elementos presentes en los promotores o potenciadores de genes sensibles a hormonas (véase figura 12-47). Esta interacción da lugar a un aumento o disminución de la tasa de transcripción génica.
- Finalmente, existen otros tipos de receptores que actúan por mecanismos únicos. Algunos de estos receptores, por ejemplo, los receptores de células B y T que están implicados en la respuesta a antígenos extraños, se asocian con moléculas de señalización conocidas, como las cinasas citoplásmicas de la proteína tirosina. Este capítulo se concentrará en los GPCR y las RTK.

**REPASO**

1. Proporcione ejemplos de cuatro tipos diferentes de moléculas que puedan actuar como mensajeros extracelulares.

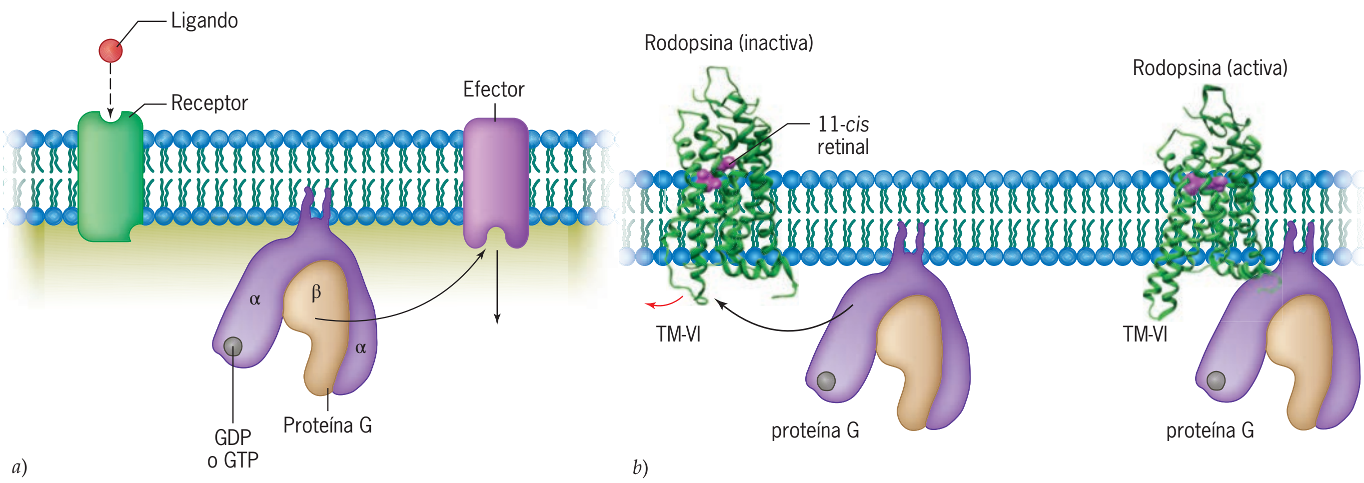



**FIGURA 15-5 La maquinaria unida a la membrana para transducir señales por medio de un receptor de siete transmembranas y una proteína G heterotrimérica.** *a*) Los receptores de este tipo, incluidos los que se unen a la epinefrina y al glucagón, contienen siete hélices que cruzan la membrana. Cuando se une a su ligando, el receptor interactúa con una proteína G trimérica, que activa un efector, como la adenilil ciclasa. Como se indica en la figura, las subunidades α y γ de la proteína G están unidas a la membrana por grupos de lípidos que están incrustados en la bicapa lipídica. (*Nota:* muchos GPCR pueden ser activos como complejos de dos o más moléculas receptoras). *b*) Un modelo que representa la activación de la rodopsina GPCR basada en estructuras cristalográficas de rayos X. A la izquierda, las rodopsinas se muestran en su conformación inactiva (adaptada a oscuridad) junto con una proteína G heterotrimérica no unida (llamada transducina). Cuando el cofactor retinal (que se muestra en rosado incrustado en las proteínas de la rodopsina) absorbe un fotón, experimenta una reacción de isomerización (de una forma *cis* a una *trans*), lo que conduce a la interrupción de un enlace iónico entre los residuos en la tercera y sexta hélices transmembrana de la proteína. Este evento a su vez conduce a un cambio en la conformación de la proteína, que incluye la inclinación y rotación hacia afuera de la sexta hélice transmembrana (flecha curva roja), que expone un sitio de unión para la subunidad $G_{\alpha}$ de la proteína G. La molécula de rodopsina de la derecha se muestra en la conformación activa con una porción de la subunidad $G_{\alpha}$ unida a la lámina citoplásmica del receptor.

FUENTE: *b*) Tomada de Thue W Schwartz y Wayne L Hubbell. *Nature* 2008;455:473. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

## 15.3 Transducción de señal por receptores acoplados a proteína G

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) se denominan así porque interactúan con las proteínas G, como se analiza a continuación. Los miembros de la superfamilia GPCR también se denominan receptores transmembranales siete (7TM, *seven-transmembrane*) porque contienen siete hélices transmembrana (**FIGURA 15-5*b***). Se han identificado miles de diferentes GPCR en organismos que van desde levaduras hasta fanerógamas, y mamíferos, que juntos regulan un extraordinario espectro de procesos celulares. De hecho, el GPCR constituye la única superfamilia más grande de proteínas codificadas por genomas animales. Entre los ligamentos naturales que se unen al GPCR se incluyen una variedad de hormonas (tanto vegetales como animales), neurotransmisores, derivados del opio, quimiotácticos (p. ej., moléculas que atraen células fagocíticas del sistema inmunitario), odorantes y saborizantes (moléculas detectadas por receptores olfativos y gustativos que provocan los sentidos del olfato y el gusto), y fotones. En la tabla 15-1 se brinda una lista de algunos de los ligandos que operan por medio de esta vía y los efectores a través de los cuales actúan.

### Receptores

Los receptores acoplados a proteína G normalmente tienen la siguiente topología. Su terminación amino está presente en el exterior de la célula, las siete hélices alfa que cruzan la membrana plasmática están relacionadas por asas de longitud variada, y la terminación carboxilo está presente en el interior de la célula (figura 15-5*b*). Hay tres asas presentes en el exterior de la célula que, juntas, forman el sitio de unión con el ligando, cuya estructura varía entre diferentes GPCR. También hay tres asas presentes en

**TABLA 15-1 Ejemplos de procesos fisiológicos mediados por GPCR y proteínas G heterotriméricas**

| Estímulo | Receptor | Efector | Physiologic response |
|---|---|---|---|
| Epinefrina | Receptor betaadrenérgico | Adenilil ciclasa | Degradación del glucógeno |
| Serotonina | Receptor de serotonina | Adenilil ciclasa | Sensibilización conductual y aprendizaje en *Aplysia* |
| Luz | Rodopsina | cGMP fosfodiesterasa | Excitación visual |
| Complejos IgE-antígeno | Receptor de IgE del mastocito | Fosfolipasa C | Secreción |
| Péptido f-Met | Receptor quimiotáctico | Fosfolipasa C | Quimiotaxis |
| Acetilcolina | Receptor muscarínico | Canal del potasio | Disminución de la actividad de marcapasos |

Adaptado de L Stryer y HR Bourne, reproducido con permiso del *Annual Review of Cell Biology* (2), copyright 1986, por Annual Reviews Inc. Annual Review of Cell Biology por Annual Reviews, Inc. Reproducido con permiso de Annual Reviews, en formato de reedición en un libro a través de Copyright Clearance Center.

el lado citoplásmico de la membrana plasmática que proporcionan sitios de unión para proteínas intracelulares de señalización. Es muy difícil, por una serie de razones técnicas, preparar cristales de GPCR sin modificar que sean adecuados para el análisis cristalográfico de rayos X. Por varios años, la rodopsina fue el único miembro de la superfamilia que tenía determinada su estructura cristalina de rayos X. La rodopsina tiene una estructura estable inusual para un GPCR, debido al hecho de que su ligando (un grupo retinal) está unido permanentemente a la proteína, y la molécula de proteína sólo puede existir en una única conformación inactiva en ausencia de un estímulo (es decir, en la oscuridad). A partir de 2007, como resultado de años de esfuerzo de varios grupos de investigación, una oleada de estructuras cristalinas GPCR apareció en la literatura. En su mayor parte, estas estructuras revelaron al GPCR en el estado inactivo, pero reportes más recientes han descrito las estructuras de varios GPCR en estados activos e intermedios.

La primera estructura cristalina de rayos X de un GPCR activo con su proteína G unida, fue resuelta por Brian Kobilka y sus colegas en la Universidad Stanford. La conformación inactiva del GPCR se estabiliza por interacciones no covalentes entre residuos específicos en las hélices alfa transmembrana. La unión a un ligando perturba estas interacciones, causando de este modo que el receptor asuma una conformación activa. Esto requiere rotaciones o giros de las hélices alfa transmembrana relacionadas entre sí. Debido a que están unidas a asas citoplásmicas, la rotación o desplazamiento de estas hélices alfa transmembrana causa cambios en la conformación de las asas citoplásmicas. Esto a su vez conduce a un aumento en la afinidad del receptor por una proteína G que se encuentra presente en la superficie citoplásmica de la membrana plasmática (figura 15-5*b*). Como consecuencia, el receptor unido a ligando forma un complejo receptor-proteína G (**FIGURA 15-6**, paso 1). La interacción con el receptor induce un cambio conformacional en la subunidad α de una proteína G, causando la liberación del difosfato de guanosina (GDP), seguida por la unión de GTP (paso 2). Mientras, en estado activado, un único receptor puede activar una cantidad de moléculas de proteína G, proveyendo un medio de amplificación de señal (discutido más adelante en la p. 600).

## Proteínas G

Las proteínas G heterotriméricas fueron descubiertas, purificadas y caracterizadas por Martin Rodbell y sus colegas en los Institutos Nacionales de Salud, y Alfredo Gilman con sus colegas en la Universidad de Virginia. Sus estudios se discuten en la "Vía experimental". Estas proteínas se conocen como proteínas G por-

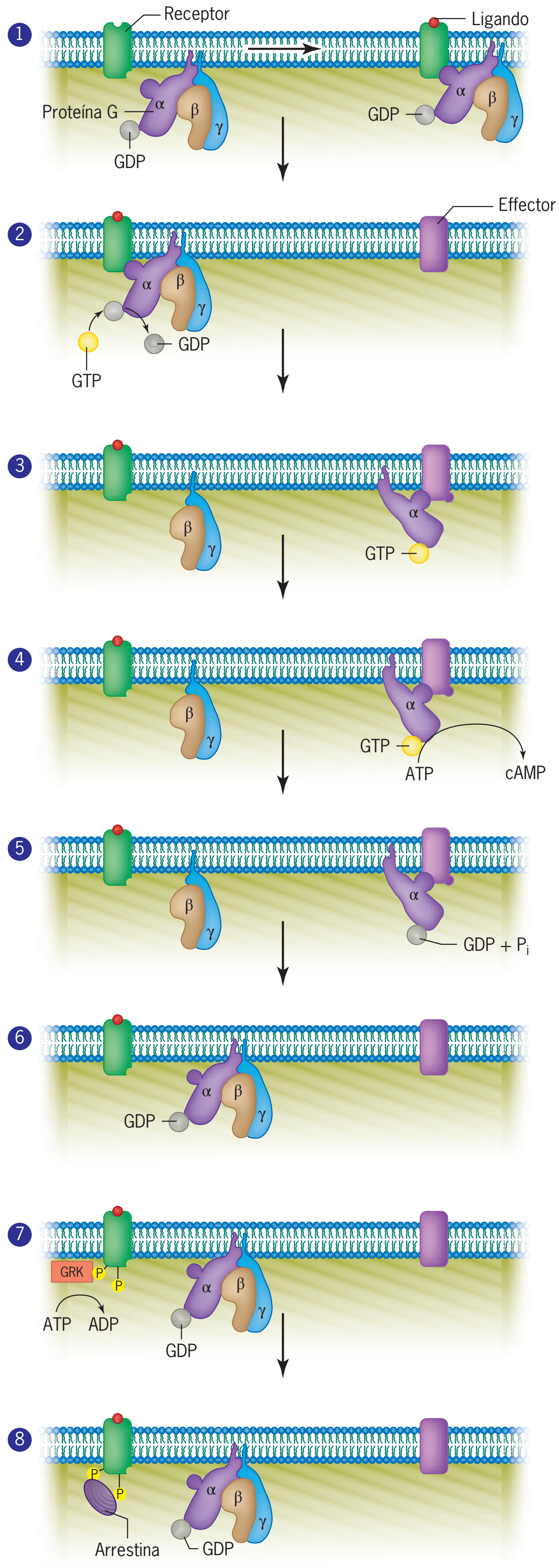



**FIGURA 15-6 El mecanismo de activación mediada por receptor (o inhibición) de efectores por medio de proteínas G heterotriméricas.** En el paso 1, el ligando se une al receptor, alterando su conformación e incrementando su afinidad por la proteína G a la que se une. En el paso 2, la subunidad $G_\alpha$ libera su GDP, el cual se reemplaza por GTP. En el paso 3, la subunidad $G_\alpha$ se disocia del complejo $G_{\beta\gamma}$ y se une a un efector (en este caso adenilil ciclasa), activando el efector. El dímero $G_{\beta\gamma}$ también puede unirse a un efector (no se muestra), como un canal iónico o una enzima. En el paso 4, la adenilil ciclasa activada produce cAMP. En el paso 5, la actividad GTPasa de $G_\alpha$ hidroliza GTP unido, desactivando $G_\alpha$. En el paso 6, $G_\alpha$ se reasocia con $G_{\beta\gamma}$, reformando la proteína G trimérica, y el efector cesa su actividad. En el paso 7, el receptor ha sido fosforilado por un GRK, y en el paso 8 el receptor fosforilado se ha unido por una molécula de arrestina, que inhibe que el receptor unido a ligando active proteínas G adicionales. El receptor unido a arrestina es probable que sea absorbido por endocitosis.

que unen nucleótidos de guanina, ya sea GDP o GTP. Se describen como heterotriméricas porque todas ellas consisten de tres subunidades de polipéptidos diferentes, llamadas $\alpha$, $\beta$, y $\gamma$. Esta propiedad las distingue de pequeñas proteínas G monoméricas, como Ras, que se analizan más adelante en este capítulo. Las proteínas G heterotriméricas se mantienen en la membrana plasmática por cadenas de lípidos que se unen covalentemente a las subunidades $\alpha$ y $\gamma$ (figura 15-5*a*).

El sitio de unión al nucleótido de guanina está presente en la subunidad $G_\alpha$. La sustitución del GDP por GTP, después de la interacción con un GPCR activado, resulta en un cambio conformacional en la subunidad $G_\alpha$. En su conformación unida a GTP, la subunidad $G_\alpha$ tiene una baja afinidad por $G_{\beta\gamma}$, conduciendo a la disociación del complejo trimérico. Cada subunidad $G_\alpha$ disociada (con GTP unido) es libre para activar una proteína efectora, como la adenilil ciclasa (figura 15-6, paso 3). En este caso, la activación del efector conduce a la producción del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (paso 4). Otros efectores incluyen fosfolipasa C-$\beta$ y fosfodiesterasa de GMP cíclico (véase más adelante). Los segundos mensajeros, en cambio, activan una o más proteínas de señalización celular.

Se dice que una proteína G está "encendida" cuando su subunidad $\alpha$ está unida a GTP. Las subunidades $G_\alpha$ pueden apagarse por hidrólisis de GTP a GDP y fosfato inorgánico (Pi, *inorganic phosphate*) (figura 15-6, paso 5). Esto resulta en un cambio conformacional que causa una disminución en la afinidad por el efector y un aumento en la afinidad por la subunidad $\beta\gamma$. Así, después de la hidrólisis de GTP, la subunidad $G_\alpha$ se disociará del efector y se reasociará con la subunidad $\beta\gamma$ para reformar a la proteína G heterotrimérica inactiva (paso 6). En un sentido, las proteínas G heterotriméricas funcionan como temporizadores moleculares. Ellas se encienden por la interacción con un receptor activado y se apagan a sí mismas por hidrólisis de unión a GTP después que haya pasado una cierta cantidad de horas. Mientras ellas permanecen activas, las subunidades $G_\alpha$ pueden encender los efectores corriente abajo.

Las proteínas heterotriméricas G poseen cuatro formas, $G_s$, $G_q$, $G_i$ y $G_{12/13}$. Esta clasificación se basa en subunidades $G_\alpha$ y los efectores a los cuales se acoplan. La respuesta particular provocada por un GPCR activado depende del tipo de proteína G con la cual interactúa, aunque algunos GPCR pueden interactuar con diferentes proteínas G y desencadenar más de una respuesta fisiológica. Los miembros de la familia $G_s$ acoplan los receptores a la adenilil ciclasa. La adenilil ciclasa se activa por subunidades unidas a GTP. Los miembros de la familia $G_q$ contienen subunidades $G_\alpha$ que activan PLC$\beta$. El PLC$\beta$ hidroliza fosfatidilinositol bisfosfato, produciendo inositol trifosfato y diacilglicerol (p. 598). Las subunidades $G_i$ activadas funcionan inhibiendo la adenilil ciclasa. Los miembros $G_{12/13}$ están menos bien caracterizados que otras familias de proteínas G, aunque su activación inapropiada se ha asociado con la proliferación celular excesiva y la transformación maligna. Después de su disociación de la subunidad $G_\alpha$, el complejo $\beta\gamma$ también tiene una función de señalización y se puede unir a varios tipos diferentes de efectores, incluyendo PLC$\beta$, canales de iones $K^+$ y $Ca^+$ y adenilil ciclasa.

## Terminación de la respuesta

Se ha visto que la unión del ligando da como resultado la activación del receptor. Los receptores activados encienden las proteínas G y estas encienden a los efectores. Para evitar la sobreestimulación, los receptores tienen que ser bloqueados de continuar activando las proteínas G. Para recuperar la sensibilidad a estímulos futuros, el receptor, la proteína G, y el efector deben ser devueltos a su estado inactivo. La *desensibilización,* el proceso que bloquea los receptores activos de encender las proteínas G adicionales, tiene lugar en dos pasos. En el primer paso, el dominio citoplásmico del GPCR activado se fosforila por un tipo específico de cinasa, llamada cinasa de receptor acoplado a proteína G (GRK, *G protein-coupled receptor kinase*) (figura 15-6, paso 7). La GRK forma una pequeña familia de cinasas proteínicas de serina-treonina que reconoce específicamente al GPCR activado.

La fosforilación del GPCR prepara el escenario para el segundo paso, que es la unión de proteínas, llamadas *arrestinas* (figura 15-6, paso 8). Estas forman una pequeña familia de proteínas que se unen al GPCR y compiten por la unión con proteínas G heterotriméricas. Como consecuencia, la unión a arrestinas previene la activación posterior de proteínas G adicionales. Esta acción se denomina desensibilización porque la célula cesa de responder a estímulos a pesar de la presencia continuada del estímulo en la superficie exterior de la célula. La desensibilización es uno de los mecanismos que permite a una célula responder a un cambio en su entorno, más que continuar su "disparo" de modo indefinido en la presencia de un entorno inmutable. La importancia de la desensibilización se ilustra por la observación de que las mutaciones que interfieren con la fosforilación de la rodopsina por una GRK conducen a la muerte de las células fotorreceptoras en la retina. Este tipo de muerte celular retinal se cree que es una de las causas de ceguera resultante de la enfermedad retinitis pigmentosa.

La arrestina se puede describir como centros proteínicos en el sentido de que son capaces de unir a una variedad de proteínas diferentes involucradas en los distintos procesos intracelulares. Mientras ellas están ligadas a los GPCR fosforilados (paso 1, **FIGURA 15-7**), las moléculas de arrestina también son capaces de unirse a moléculas adaptadoras AP2 que están situadas en fosas recubiertas de clatrina (sección 8.17). La interacción entre arrestinas unidas y fosas recubiertas de clatrina (paso 2) promueve la captación de GPCR fosforilado en la célula por endocitosis. Dependiendo de las circunstancias, los receptores que han sido eliminados de la superficie por endocitosis pueden participar en varios resultados alternativos. En algunos casos, los receptores viajan a lo largo de la vía endocítica dentro de los endosomas (sección 8.17), donde las moléculas de arrestina asociadas sirven como un andamio para el ensamblaje de varios complejos de señalizaciones citoplásmicas. Las vías MAPK que se discuten a plenitud luego en el capítulo, se considera que están activadas por GPCR unidos a arrestinas localizadas dentro del endosoma (paso 3). El descubrimiento de "los endosomas de señalización" llegó en el campo de la señalización celular como una sorpresa para los investigadores, quienes habían estado trabajando bajo la suposición de que el GPCR (y también las RTK) eran los únicos capaces de la transducción de señal cuando residían en la superficie celular. Ahora aparece que las señales transmitidas por los endosomas tienen diferentes propiedades y funciones fisiológicas de aquellas que surgen de la membrana plasmática. En un segundo resultado, los receptores internalizados pudieran traficar desde los endosomas a los lisosomas donde ellos se degradan (paso 4). Si los receptores se degradan, las células pierden, al menos de modo temporal, sensibilidad por el ligando en cuestión. Finalmente, de acuerdo con un tercer esquema, GPCR unidos a arrestina pudieran desfosforilarse y retornar a la membrana plasmática (paso 5). Si los receptores retornan a la superficie celular, las células permanecen sensibles al ligando (se dice que son *resensibilizados*).

La señalización por la subunidad $G_\alpha$ activada se termina por un mecanismo menos complejo: la molécula de GTP unida simplemente se hidroliza a GDP (paso 5, figura 15-6) Así, la fuerza y duración de la señal se determinan en parte por la tasa de hidrólisis de GTP por la subunidad $G_\alpha$. Las subunidades $G_\alpha$ poseen una débil actividad de la GTPasa, lo cual les permite hidrolizar lentamente la unión GTP e inactivarla. La terminación de la respuesta se acelera por reguladores de señalización de la proteína G (RGS, *regulators of G protein signaling*). La interacción con una proteína RGS aumenta la tasa de hidrólisis de GTP por la subunidad $G_\alpha$. Una vez que el GTP está hidrolizado, el $G_\alpha$-GDP se reasocia con

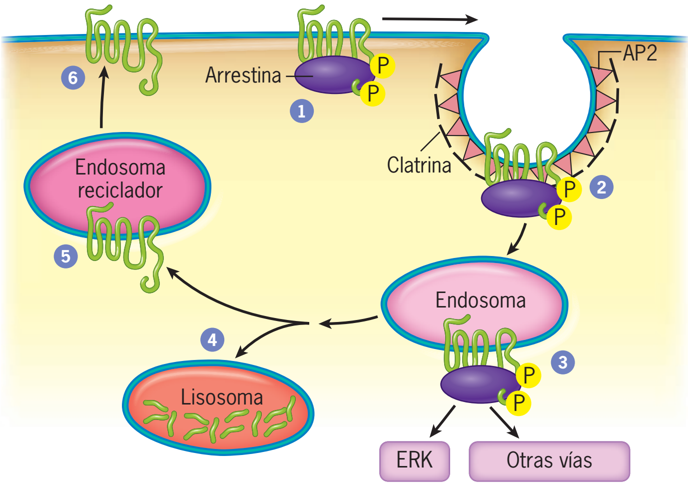



**FIGURA 15-7 Internalización de los GPCR mediada por arrestina.** Los GPCR unidos a arrestina (paso 1) se internalizan cuando quedan atrapados en fosas recubiertas de clatrina que brotan en el citoplasma (paso 2). Como se discutió en la sección 8.8, los brotes recubiertos de clatrina se transforman en vesículas recubiertas de clatrina que entregan sus contenidos, incluido el GPCR, a los endosomas. Cuando están presentes en los endosomas, las arrestinas pueden servir como andamios para el ensamblaje de complejos de señalización, incluyendo los que activan la cascada de MAPK y el factor de transcripción ERK (paso 3). Alternativamente, los GPCR se pueden entregar a los lisosomas, donde se degradan (paso 4), o pueden ser devueltos a la membrana plasmática en un endosoma reciclador (paso 5), donde pueden luego interactuar con nuevos ligandos extracelulares (paso 6).

FUENTE: Tomado de SL Ritter y RA Hall. *Nature Reviews MCB* 2009;10:820, Box 1b. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* de Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto mediante Copyright Clearance Center.

las subunidades $G_{\beta\gamma}$ para reformar el complejo trimérico inactivo (paso 6) como se discutió anteriormente. Esto devuelve al sistema al estado de reposo.

El mecanismo para transmitir señales a través de la membrana plasmática por las proteínas G es de origen evolutivo antiguo y está muy conservado. Esto se ilustra mediante un experimento en el que las células de levadura fueron genéticamente modificadas para expresar un receptor para la hormona de mamífero somatostatina. Cuando estas células de levadura fueron tratadas con somatostatina, los receptores de mamífero en la superficie celular interactuaron con las proteínas G heterotriméricas en el interior de la superficie de la membrana y desencadenaron una respuesta que condujo a la proliferación de las células de levadura.

Los efectos de ciertas mutaciones en la función de los receptores acoplados a la proteína G se discuten en la "Perspectiva humana" (sección 15.5).

## Toxinas bacterianas

Debido a que las proteínas G son tan importantes para la fisiología normal de organismos multicelulares, proporcionan excelentes blancos para los patógenos bacterianos. Por ejemplo, la toxina del cólera (producida por la bacteria *Vibrio cholerae*) ejerce su efecto modificando a las subunidades $G_\alpha$ e inhibiendo su actividad GTPasa en las células del epitelio intestinal. Como resultado, las moléculas de adenilil ciclasa permanecen en un modo activado, produciendo cAMP, que causa que las células epiteliales secreten grandes volúmenes de líquido en la luz intestinal. La pérdida de agua asociada con esta respuesta inapropiada a menudo conduce a la muerte debido a la deshidratación.

La toxina *pertussis* es uno de los varios factores de virulencia producidos por *Bordetella pertussis*, un microorganismo que causa tos ferina. Esta es una infección del tracto respiratorio debilitante que se observa en 50 millones de personas en todo el mundo cada año, y causa la muerte en aproximadamente 350 000 de estos casos anualmente. La toxina *pertussis* también inactiva las subunidades $G_\alpha$, lo que interfiere con la vía de señalización que conduce al huésped a organizar una respuesta defensiva contra la infección bacteriana.

### REPASO

1. ¿Cuál es la función de las proteínas G en una vía de señalización?
2. Describa los pasos entre la unión de un ligando como el glucagón a un receptor de siete transmembranas y la activación de un efector, como la adenilil ciclasa. ¿Cómo se suele atenuar la respuesta?

# 15.4 VÍAS EXPERIMENTALES

## El descubrimiento y la caracterización de las proteínas de unión a GTP

Durante las décadas de 1950 y 1960, Earl Sutherland y sus colegas en la Universidad Case Western Reserve descubrieron ciertas hormonas, como la epinefrina, que actúan uniéndose a un receptor específico en la superficie celular, lo que activa la enzima adenilil ciclasa en el interior de la membrana. Esta activación conduce a la producción de un segundo mensajero, el AMP cíclico, el cual se difunde en el citoplasma para iniciar la respuesta celular.[revisado en 1] A finales de 1960, el concepto del segundo mensajero estaba bien establecido, pero se sabía poco sobre el mecanismo molecular preciso que permitía que una hormona (u otro ligando) se uniera en el exterior de la membrana para activar la actividad de la adenilil ciclasa. Se consideró una posibilidad muy probable de que el sitio activo de la adenilil ciclasa fuera parte del mismo receptor de hormonas.

Para conocer más sobre la relación entre los receptores de hormonas y la adenilil ciclasa, Martin Rodbell y Lutz Birnbaumer, de los Institutos Nacionales de Salud, comenzaron una serie de experimentos sobre las membranas plasmáticas aisladas de células de grasa y células hepáticas.[2] Una de las primeras preguntas que intentaron responder era si estas células, que responden a varias hormonas diferentes al producir cAMP, poseen una sola adenilil ciclasa que se activa por todas las diversas hormonas o

tienen adenilil ciclasas separadas para cada una de las hormonas a las que responden. Las células grasas se eligieron para estos estudios iniciales debido a que son fácilmente aisladas libres de otros tipos de células, responden a varias hormonas que causan un aumento rápido en los niveles intracelulares de cAMP (enzimas estimulantes implicadas en la degradación de los lípidos) y sus membranas plasmáticas pueden aislarse como "fantasmas" por lisis osmótica. Se descubrió que seis hormonas diferentes (ACTH, epinefrina, glucagón, TSH, LH y prolactina) estimulan la actividad de la adenilil ciclasa en células grasas fantasmas aisladas. Las curvas de respuesta a la dosis de las tres primeras hormonas que actúan por separado se muestran en la **FIGURA 1**. Como se muestra en la tabla 1, cuando estas hormonas se combinaron en series de dos o tres, sus efectos sobre la actividad de la adenilil ciclasa no fueron aditivos, lo que sugiere que cada una de estas hormonas estimula la misma población de moléculas de adenilil ciclasa. Sin embargo, se demostró que las diferentes hormonas interactúan con receptores espacialmente diferenciados. En conjunto, estos hallazgos le permitieron a Rodbell y Birnbaume proponer que, aunque los diversos receptores hormonales estimulan una población común de moléculas de adenilil ciclasa, los receptores y los efectores adenilil ciclasa existen separados unos de otros en las membranas plasmáticas de las células grasas.

En 1971 Rodbell y sus colegas publicaron una serie de artículos sobre la estimulación de la adenilil ciclasa en las membranas plasmáticas aisladas de células hepáticas en respuesta al glucagón y la epinefrina. Primero, midieron la unión de moléculas de glucagón marcadas radiactivamente al receptor en membranas plasmáticas aisladas. Debido a que el ATP es un sustrato de la reacción de la adenilil ciclasa, los efectos del ATP en la unión del glucagón marcado se controlaron, como lo fueron los efectos de los otros tres nucleósidos trifosfatos comunes, UTP, CTP y GTP. Fue durante estas investigaciones que se señalaron las propiedades especiales del GTP.[3] Uno de los efectos observados de los nucleósidos trifosfatos fue que causan la disociación del glucagón marcado que estaba unido a las membranas plasmáticas aisladas. Mientras que ATP, UTP y CTP no afectaron la disociación del glucagón de las membranas a concentraciones inferiores a 100 mM, el GTP estimuló la disociación a concentraciones tan bajas como 0.05 mM. En la **FIGURA 2** se muestra una comparación de los efectos de ATP y GTP en la causa de la disociación del glucagón de la membrana. (Téngase en cuenta que la concentración se traza en una escala logarítmica, indicando las grandes diferencias en la efectividad de los dos trifosfatos.) Estos resultados sugirieron al autor que los nucleótidos de guanilo inducen un cambio en el estado o propiedades del receptor de glucagón que disminuye su afinidad por el glucagón. Además, descubrieron que las membranas hepáticas pueden hidrolizar GTP.

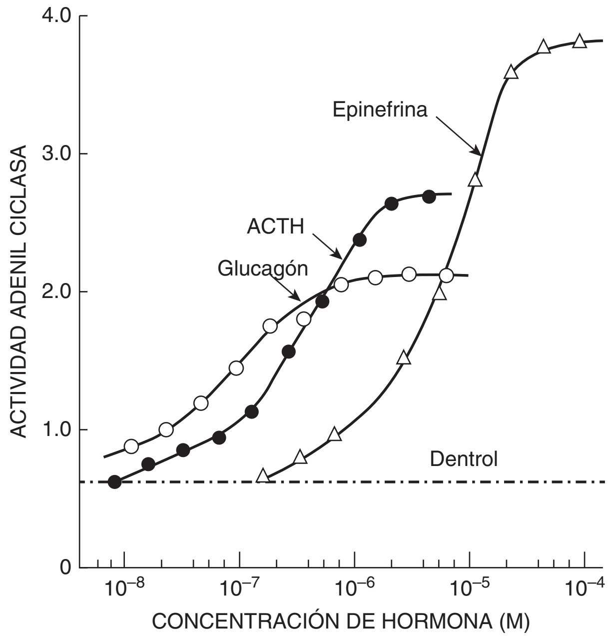



**FIGURA 1 Efectos de las concentraciones variables de ACTH, epinefrina y glucagón en la actividad adenilil ciclasa de la célula grasa fantasma.** La línea punteada representa la actividad en ausencia de hormonas añadidas. (La adenilil ciclasa se llamó inicialmente adenil ciclasa y más tarde se nombró adenilato ciclasa).

FUENTE: De L Birnbaumer y M Rodbell. *J Biol Chem* 1969;244:3478.

En el último artículo de la serie, Rodbell y sus colegas abordaron la cuestión de si los efectos de los nucleótidos de guanilo en la unión del glucagón guardan alguna relación con las acciones del glucagón en el sistema adenilil ciclasa de las membranas hepáticas.[4] Como se muestra en la **FIGURA 3**, el GTP estimuló la actividad basal de la adenilil ciclasa y lo hizo a concentraciones tan bajas como 0.01 mM. Ninguno de los otros nucleótidos poseía esta actividad. Los autores concluyeron que los nucleótidos de guanilo son necesarios para la activación de la adenilil ciclasa por el glucagón. Estudios posteriores en otros laboratorios demostraron que el GTP potencia la respuesta de los sistemas de adenilil ciclasa a otras hormonas, aun las hormonas peptídicas, las catecolaminas (p. ej., epinefrina) y las prostaglandinas.

Los análogos no hidrolizables de los nucleósidos trifosfatos son útiles porque permiten a los investigadores distinguir entre los efectos de la unión de nucleótidos de los de la

**TABLA 1 Efectos de las combinaciones de hormonas, a concentraciones supramáximas, sobre la actividad de la adenilil ciclasa en las células grasas fantasma***

| | Cambio en la actividad de la adenilil ciclasa debido a las hormonas | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Experimento 1 (37°) | | Experimento 2 (30°) | |
| **Adiciones** | **Hallazgos** | **Calculado si es aditivo** | **Hallazgos** | **Calculado si es aditivo** |
| ACTH | 0.57 ± 0.02 | | 1.19 ± 0.07 | |
| Epinefrina | 1.00 ± 0.06 | | 1.79 ± 0.11 | |
| Glucagón | 0.32 ± 0.01 | | 0.57 ± 0.04 | |
| ACTH + epinefrina | 0.80 ± 0.04 | 1.57 | 2.04 ± 0.12 | 2.98 |
| Epinefrina + glucagón | 0.99 ± 0.05 | 1.26 | 2.13 ± 0.10 | 2.36 |
| ACTH + glucagón | 0.64 ± 0.02 | 0.89 | 1.33 ± 0.06 | 1.76 |
| ACTH + epinefrina + glucagón | 0.85 ± 0.04 | 1.88 | 2.30 ± 0.10 | 3.55 |

* La actividad de adenilil ciclasa se midió a 37° en ausencia del, o a 30° en presencia del, sistema regenerador de ATP. Las siguientes concentraciones de las hormonas utilizadas, ya sea individualmente o en combinación: ACTH, 400 µg por mL; epinefrina, 400 µg por mL; glucagón, 60 µg por mL. Los valores son la media de la determinación por triplicado ± desviación estándar.
*Fuente*: L Birnbaumer y M Rodbell. *J Biol Chem* 1969;244:3479.

(*continúa*)

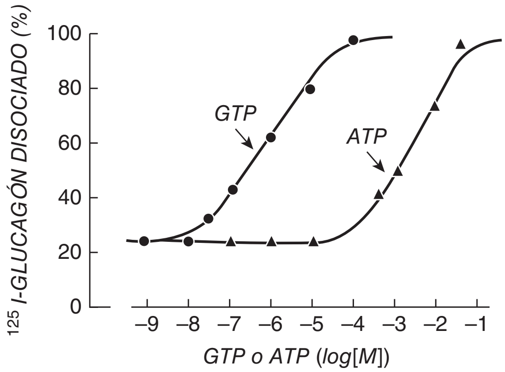



**FIGURA 2 Efectos de las concentraciones variables de GTP y ATP en la disociación de [$^{125}$I] glucagón de las membranas plasmáticas de celulas hepáticas.** En este experimento, las membranas se preincubaron por 15 minutos en un medio que contenía glucagón marcado. Entonces se añadió GTP o ATP en presencia de un gran exceso de glucagón no marcado. Después de 15 minutos de incubación en uno u otro nucleósido trifosfato, se tomaron muestras para medir el glucagón marcado que permanecía unido. El porcentaje de unión, el glucagón marcado disociado durante la incubación con ATP o GTP, se calculó comparando la radiactividad unida presente en el comienzo y al final de los 15 minutos de la incubación con el nucleósido trifosfato.

FUENTE: De M Rodbell, *et al. J Biol Chem* 1971;246:1873.

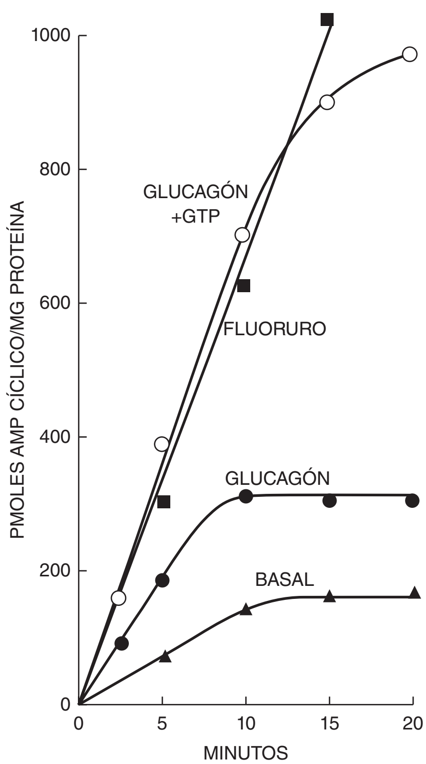



**FIGURA 3 El efecto del ion fluoruro, el glucagón y una combinación de glucagón y GTP en la formación de AMP cíclico por una preparación de membranas plasmáticas de células hepáticas aisladas.** La estimulación marcada por GTP que se muestra aquí se logró con una concentración de GTP de 0.01 mM. También se descubrió que el ion fluoruro es un activador efectivo de adenilil ciclasa y se usó en numerosos ensayos posteriores.

FUENTE: De M Rodbell, *et al. J Biol Chem* 1971;246:1879.

hidrólisis de nucleótidos. Cuando un análogo no hidrolizable del GTP, 5´guanililimododifosfato, Gpp(NH)p (*5´-guanylylimodo diphosphate*) se incubó con las membranas plasmáticas del hígado, el glucagón, ATP, y otros ingredientes necesarios para la activación de la adenilil ciclasa, Gpp(NH)p imitó los efectos estimulatorios del GTP. De hecho, el análogo del GTP no hidrolizable activó la adenilil ciclasa incluso en la ausencia de hormonas.[5] Estos resultados indicaron que la unión de GTP, en lugar de su hidrólisis, desempeñó una función importante en la activación de la adenilil ciclasa. La principal diferencia entre los efectos del GTP y un análogo del GTP no hidrolizable es que el primero estimula la adenilil ciclasa sólo transitoriamente, mientras que el último estimula la enzima por un periodo prolongado. Estos hallazgos llevaron a los investigadores a enfocarse en el mecanismo por el cual el GTP normalmente se hidroliza por el sistema de la adenilil ciclasa.

A mediados de la década de 1970, varios laboratorios, incluyendo el de Rodbell, identificaron una GTPasa ubicada dentro de las membranas plasmáticas de varias células. En un estudio clave Don Cassel y Zvi Selinger, de la Universidad hebrea de Jerusalén, descubrieron que la adición de isoproterenol (una hormona de catecolamina similar a la epinefrina) al sistema de ensayo de la membrana plasmática GTPasa causó 30-70% de aumento en la hidrólisis de [$^{32}$p] GTP cuando se midió la liberación de 32Pi (**FIGURA 4**).[6] Cassel y Selinger propusieron que la hidrólisis del GTP por la GTPasa sirve para apagar la adenilil ciclasa activada, retornando la enzima al estado basal inactivo.

En un estudio posterior, estos mismos investigadores hicieron una conexión importante entre la proteína de unión al GTP, como llegó a ser llamada, y la infame toxina del cólera. Esta es una enfermedad causada por una toxina bacteriana que produce diarrea en exceso y la consiguiente pérdida de agua en individuos infectados. Durante los inicios de la década de 1970, varios laboratorios descubrieron que la toxina del cólera actúa estimulando la adenilil ciclasa en las células del epitelio intestinal. Se hizo evidente que la toxina del cólera imita la acción de las hormonas al actuar sobre uno de los componentes comúnmente

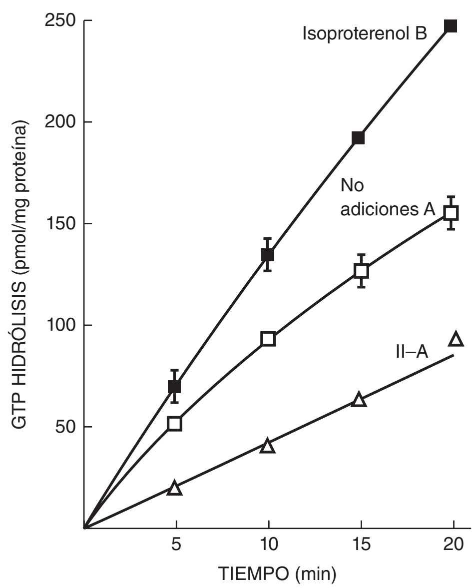



**FIGURA 4 El curso temporal de la hidrólisis de GTP en presencia y ausencia de la catecolamina isoproterenol por membranas de eritrocitos aisladas de pavo.** El efecto de la hormona se observa en la curva inferior, que traza la diferencia en la hidrólisis de GTP entre preparaciones de hormonas tratadas y membranas controladas.

FUENTE: Reimpreso de D Cassel y Z Selinger. Catecholamin estimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1976;452:543. Copyright 1976, con permiso de Elsevier Science.

presentes en el sistema adenilil ciclasa. En 1977 Cassel y Selinger demostraron que la toxina actuaba inhibiendo la actividad de la GTPasa de la membrana, que tenía el efecto de mantener la adenilil ciclasa en un estado estimulado prolongado (**FIGURA 5**).[7]

Los resultados de estos y otros experimentos demostraron la existencia de un componente regulador del sistema hormona-adenilil ciclasa que se activó mediante la unión del GTP y se desactivó mediante la hidrólisis del GTP. La atención se dirigió a varias otras cuestiones. ¿Es la proteína de unión al GTP una parte integral de la adenilil ciclasa o un componente separado? Si la proteína de unión al GTP es un componente separado, ¿cuál es su estructura y cómo interactúa con los otros componentes principales del sistema, el receptor y la adenilil ciclasa?

La purificación de la proteína de unión al GTP fue llevada a cabo en 1980 por Alfred Gilman y sus colaboradores en la Universidad de Virginia. La purificación se logró extrayendo proteínas de las membranas plasmáticas hepáticas en detergente y sometiendo la mezcla a seis procedimientos cromatográficos sucesivos (tabla 2).[8] Como se indica en la tabla, la actividad específica del extracto detergente aumentó aproximadamente 2 000 veces durante el procedimiento de purificación, que corresponde a una purificación de 5 000 a 10 000 veces de las membranas plasmáticas, o aproximadamente 100 000 veces de la proteína celular total. Cuando la proteína de unión a GTP purificada fue sometida a SDS-PAGE, se encontraron tres polipéptidos distintos (masas moleculares relativas de 52, 45 y 35 kDa), lo que indica que la proteína reguladora era un complejo de multisubunidades. De los tres polipéptidos identificados en el estudio inicial, el polipéptido de 52 kDa estaba presente en cantidades mucho más pequeñas y variables y finalmente se descubrió que no era miembro de la proteína de unión al GTP. El polipéptido de 45 kDa se conoce como la subunidad α y el polipéptido de 35 kDa como la subunidad β. Posteriormente se descubrió un tercer polipéptido de 9 kDa (la subunidad γ). De las tres subunidades, se mostró que la subunidad α de 45 kDa es el polipéptido que contiene el sitio de unión a GTP.

La purificación de la proteína de unión al GTP sentó las bases para el análisis de las propiedades moleculares y bioquímicas de la proteína. Como resultado de estos estudios, Gilman propuso que la activación de la adenilil ciclasa sigue a la disociación de la proteína de unión a GTP en sus subunidades, y que la subunidad α disociada con un GTP unido es responsable de activar la enzima productora de cAMP.[9,10]

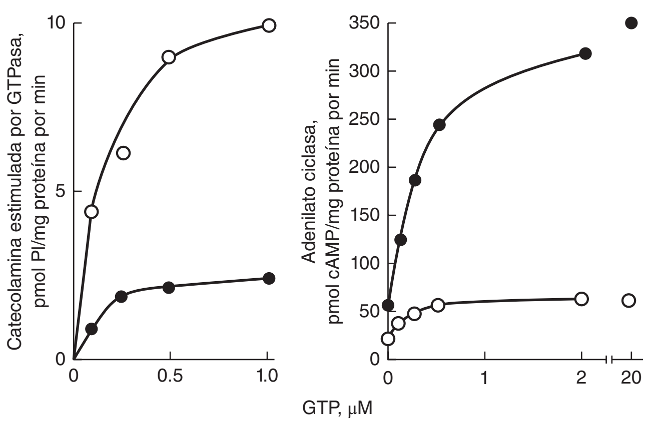



**FIGURA 5 Efecto de la toxina del cólera en las actividades de la GTPasa estimulada por catecolamina (izquierda) y de la adenilil ciclasa (derecha) en varias concentraciones de GTP.** Las membranas pretratadas en ausencia (círculos vacíos) o presencia (círculos cerrados) de toxina se analizaron en cuanto a las actividades de la GTPasa y de la adenilil ciclasa en las concentraciones de GTP indicadas. En presencia de la toxina, la actividad más baja de la GTPasa (izquierda) conduce a un nivel elevado de la actividad de la adenilil ciclasa (derecha).

FUENTE: Tomada de D Cassel y Z Selinger. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1977;74:3309.

**TABLA 2 Purificación del componente regulador de la adenilil ciclasa del hígado de conejo***

| Paso | Proteína (mg) | Total unidades (nmol/min) | Recuperación (%) | Actividad específica (nmol/min mg) |
|---|---|---|---|---|
| Extracto de quelato de membranas | 2 020 | 4 380 | 100 | 2.2 |
| DEAE-Sefacel | 114 | 2930 | 67 | 26 |
| Ultrogel AcA 34 | 9.8 | 1820 | 42 | 190 |
| Heptilamina-Sefarosa | 0.70 | 740 | 17 | 1 060 |
| Hidroxiapatita | 0.03 | 350 | 8.0 | 1 200 |
| GTP-Sefarosa | 0.18 | 290 | 6.6 | 1 600 |
| DEAE-Sefacel | 0.039 | 150 | 3.5 | 3 800 |

* Se extrajeron y purificaron membranas plasmáticas de hígado de conejo (8.6 g de proteína). La actividad se midió mediante la reconstitución de la actividad de la adenilil ciclasa activada por fluoruro. La actividad específica se define como la cantidad de actividad reconstituida por cantidad de proteína añadida a la reconstitución. Las recuperaciones son acumulativas a través de la preparación.
*Fuente*: JK Northup, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6518.

## Referencias

1. Robison, GA, Butcher, RW, & Sutherland, EW. Cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1969;37:149-174.
2. Birnbaumer, L & Rodbell, M. Adenyl cyclase in fat cells: II. Hormone receptors. *J Biol Chem* 1969;244:3477-3482.
3. Rodbell, M, *et al*. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver: IV. Effects of guanyl nucleotides on binding of $^{125}$I-glucagon. *J Biol Chem* 1971; 246:1872-1876.
4. Rodbell, M, *et al*. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver: V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 1971;246: 1877-1882.
5. Londos, C, ***et al***. 5'-Guanylylimidodiphosphate, a potent activator of adenylate cyclase systems in eukaryotic cells. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1974;71:3087-3090.
6. Cassel, D & Selinger, Z. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1976;452:538-551.
7. Cassel, D & Selinger, Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1977;74:3307-3311.
8. Northup, J, *et al*. Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1980;77:6516-6520.
9. Smigel, MD, Northup, JK, & Gilman, AG. Characteristics of the guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *Recent Prog Horm Res* 1982;38:601-624.
10. Northup, JK, *et al*. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 1983;258:11369-11376.

# 15.5 PERSPECTIVA HUMANA

## Trastornos asociados con receptores acoplados a proteína G

Los GPCR representan la familia más grande de genes codificados por el genoma humano. Su importancia en la biología humana se refleja en el hecho de que más de un tercio de todos los medicamentos recetados actúan como ligandos que se unen a esta gran superfamilia de receptores. Se han rastreado una serie de trastornos hereditarios a defectos tanto en GPCR (**FIGURA 1**) como en las proteínas G heterotriméricas (tabla 1). La retinitis pigmentosa (RP, *retinitis pigmentosa*) es una enfermedad hereditaria caracterizada por la degeneración progresiva de la retina y la posible ceguera. La RP puede ser causada por mutaciones en los genes que codifican la rodopsina, el pigmento visual de los bastones. Muchas de estas mutaciones conducen a la terminación prematura o al plegamiento incorrecto de la proteína rodopsina y su eliminación de la célula antes de alcanzar la membrana plasmática (sección 8.7). Otras mutaciones pueden conducir a la síntesis de una molécula de rodopsina que no puede activar su proteína G y que no puede pasar la señal corriente abajo al efector.

La RP resulta de una mutación que conduce a una pérdida de función del receptor codificado. Muchas mutaciones que alteran la estructura de las proteínas de señalización pueden tener un efecto opuesto, lo que se describe como una "ganancia de función". En uno de estos casos, se ha encontrado que las mutaciones causan un tipo de tumor tiroideo benigno, llamado adenoma. A diferencia de las células tiroideas normales que secretan hormona tiroidea en respuesta a la estimulación de la hormona pituitaria TSH, las células de estos adenomas tiroideos secretan grandes cantidades de hormona tiroidea sin tener que ser estimuladas por TSH (se dice que el receptor actúa de manera *constitutiva*). El receptor de TSH en estas células contiene una sustitución de aminoácidos que afecta a la estructura del tercer asa intracelular de la proteína (**FIGURA 1**, mutaciones en los sitios 5 o 6). Como resultado de la mutación, el receptor de TSH activa constitutivamente una proteína G en su superficie interna, enviando una señal continua a través de la vía que conduce no sólo a la secreción de la hormona tiroides excesiva, sino también a la proliferación celular excesiva que causa el tumor. Esta conclusión se verificó introduciendo el gen mutante en células cultivadas que normalmente carecen de este receptor y demostrando que la síntesis de la proteína mutante y su incorporación a la membrana plasmática conduce a la continua producción de cAMP en las células genéticamente modificadas.

La mutación que causa los adenomas tiroideos no se encontró en la porción normal de la tiroides de un paciente sino sólo en el tejido tumoral, lo cual indicó que la mutación no era hereditaria sino que surgió en una de las células de la tiroides, que luego proliferaron para dar lugar al tumor. Una mutación en una célula del cuerpo, como una célula tiroidea, se llama *mutación somática* para distinguirla de una mutación heredada que estaría presente en todas las células del individuo. Como será evidente en el siguiente capítulo, las mutaciones somáticas son una causa principal de cáncer en los seres humanos. Se ha demostrado que al menos un virus causante de cáncer codifica una proteína

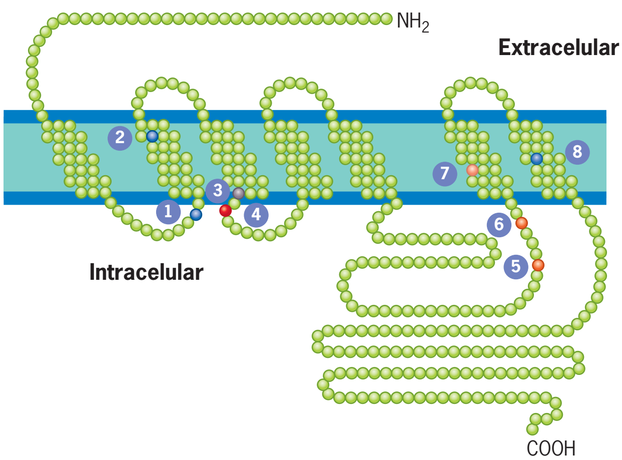



**FIGURA 1 Representación bidimensional de un receptor transmembrana "compuesto" que muestra los sitios aproximados de un número de mutaciones responsables de causar enfermedades humanas.** La mayoría de las mutaciones (números 1, 2, 5, 6, 7 y 8) resultan en estimulación constitutiva del efector, pero otros (3 y 4) resultan en el bloqueo de la capacidad del receptor de estimular al efector. Las mutaciones en los sitios 1 y 2 se encuentran en el receptor de la hormona estimulante de melanocitos (MSH, *melanocyte-stimulating hormone*); 3 en el receptor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH, *adrenocorticotrophic hormone*); 4 en el receptor de vasopresina; 5 y 6 en el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, *thyroid-stimulating hormone*); 7 en el receptor de la hormona luteinizante (LH, *luteinizing hormone*), y 8 en rodopsina, el pigmento sensible a la luz pigmento de la retina.

**TABLA 1 Enfermedades de los seres humanos relacionadas con la vía de la proteína G**

| Enfermedad | Defecto en la proteína G* |
|---|---|
| Osteodistrofia hereditaria de Albright y pseudohipoparatiroidismo | $G_{s\alpha}$ |
| Síndrome de McCune-Albright | $G_{s\alpha}$ |
| Tumores pituitarios, tiroideos (oncogén *gsp*) | $G_{s\alpha}$ |
| Tumores adrenocorticales, de ovario (oncogén *gip*) | $G_{i\alpha}$ |
| Combinada pubertad precoz y pseudohipoparatiroidismo | $G_{s\alpha}$ |
| **Enfermedad** | **Defecto del receptor acoplado a proteína G** |
| Hipercalcemia hipocalciúrica familiar | Análogo humano del receptor BoPCAR1 |
| Hiperparatiroidismo neonatal grave | Análogo humano de receptor BoPCAR1 (homocigoto) |
| Hipertiroidismo (adenomas tiroideos) | Receptor de tirotropina |
| Pubertad precoz masculina familiar | Receptor de hormona luteinizante |
| Diabetes insípida nefrogénica unida a X | Receptor de vasopresina V2 |
| Retinitis pigmentosa | Receptor de rodopsina |
| Daltonismo, variaciones de sensibilidad espectral | Receptor de opsina del cono |
| Deficiencia familiar de glucocorticoides y deficiencia aislada de glucocorticoides | Receptor de hormona adrenocorticotropa (ACTH) |
| Estatura baja, obesidad | Receptor de ghrelina |
| Obesidad grave de inicio temprano | Receptor de melanocortina-4 (hetererocigoto) |
| Disminución de la fertilidad | Receptor de hormona folicuoestimulante |

* Como se describe en el texto, una proteína G con una $G_{s\alpha}$ actúa para estimular al efector, mientras que una proteína G con una $G_{i\alpha}$ inhibe al efector.

*Fuente:* DE Clapham, reimpreso con permiso de *Nature* 1994;(371):109, copyright 1994. *Nature* por Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

que actúa como un GPCR constitutivamente activo. El virus es un tipo de virus del herpes que es responsable del sarcoma de Kaposi, que causa lesiones violáceas en la piel y es frecuente en pacientes con sida. El genoma del virus codifica un receptor constitutivamente activo para la interleucina-8, que estimula vías de señalización que controlan la proliferación celular.

Como se observa en la tabla 1, las mutaciones en los genes que codifican las subunidades de proteínas G heterotriméricas también pueden conducir a trastornos hereditarios. Esto se ilustra en un informe sobre dos pacientes masculinos que padecen una rara combinación de trastornos endocrinos: pubertad precoz e hipoparatiroidismo. Ambos pacientes contenían una única sustitución de aminoácidos en una de las isoformas G. La alteración en la secuencia de aminoácidos causó dos efectos en la proteína G mutante. A temperaturas por debajo de la temperatura normal del cuerpo, la proteína G mutante se mantuvo en estado activo, aun en ausencia de un ligando unido. Por el contrario, a temperaturas normales del cuerpo, la proteína G mutante estaba inactiva, ambas en presencia y ausencia de ligando unido. Los testículos, que son alojados fuera del núcleo del cuerpo, tienen una temperatura más baja que los órganos viscerales del cuerpo (33 °C *vs.* 37 °C). Normalmente, las células endocrinas de los testículos inician la producción de testosterona en el momento de la pubertad en respuesta a la hormona pituitaria LH, que comienza a producirse en ese momento. La LH circulante se une a los receptores LH en la superficie de las células testiculares, induciendo la síntesis de cAMP y la producción posterior de la hormona del sexo masculino. Las células testiculares de los pacientes que portan la mutación de la proteína G se estimularon para sintetizar cAMP en ausencia del ligando LH, conduciendo a la síntesis de testosterona y la pubertad precoz. En contraste, la mutación en esta misma subunidad $G_\alpha$ en las células de las glándulas paratiroides, que funcionan a una temperatura de 37 °C, causó que la proteína G permaneciera inactiva. Como resultado, las células de la glándula paratiroides no pudieron responder a los estímulos que normalmente provocarían la secreción de hormona paratiroides, lo que condujo a la enfermedad de hipoparatiroidismo. El hecho de que la mayoría de los órganos corporales funcionaran de manera normal en estos pacientes sugiere que esta isoforma $G_\alpha$ particular no es esencial en las actividades de la mayoría de las otras células.

Se considera que las mutaciones son cambios raros e incapacitantes en la secuencia de nucleótidos de un gen. Los polimorfismos genéticos, en cambio, se consideran variaciones comunes y "normales" dentro de la población (sección 10.15). Sin embargo, ha quedado claro en los últimos años que los polimorfismos genéticos pueden tener un impacto considerable en la enfermedad de los seres humanos, haciendo que ciertos individuos sean más o menos susceptibles a trastornos particulares que otros individuos. Esto ha sido bien documentado en el caso de GPCR. Por ejemplo, ciertos alelos del gen que codifican el receptor adrenérgico $\beta_2$ se han asociado con mayor probabilidad de desarrollar asma o hipertensión; ciertos alelos de un receptor de dopamina están asociados con un mayor riesgo de abuso de sustancias o esquizofrenia, y ciertos alelos de un receptor de quimiocinas (*CCR5*, *chemokine receptor*) se asocian con una supervivencia prolongada en individuos infectados por VIH. Como se discutió en el capítulo 10, la identificación de asociaciones entre la susceptibilidad a enfermedades y polimorfismos genéticos es un interés actual de la investigación clínica.

## 15.6 Segundos mensajeros

AMP cíclico es un *segundo mensajero* capaz de difundirse a otras partes dentro de la célula. La síntesis de AMP cíclico sigue la unión de un primer mensajero —una hormona u otro ligando— a un receptor en la superficie externa de la célula. En la **FIGURA 15-8** se muestra la difusión de AMP cíclico dentro del citoplasma de una neurona después de la estimulación por una molécula mensajera extracelular. Mientras que el primer mensajero se une exclusivamente a una sola especie receptora, el segundo mensajero a menudo estimula una variedad de actividades celulares. Como resultado, los segundos mensajeros permiten que las células organicen una respuesta coordinada a gran escala después de la estimulación por un único ligando extracelular. Otros segundos son $Ca^{2+}$, fosfoinosítidos, inositol trifosfato, diacilglicerol, cGMP y óxido nítrico.

### El descubrimiento de AMP cíclico

¿Cómo la unión de una hormona a la membrana plasmática cambia la actividad de las enzimas citoplásmicas, como la glucógeno fosforilasa, una enzima implicada en el metabolismo del glucógeno? La respuesta a esta pregunta fue proporcionada por estudios que comenzaron a mediados de la década de 1950 en los laboratorios de Earl Sutherland y sus colegas de la Universidad de Case Western Reserve. El objetivo de Sutherland era desarrollar un sistema *in vitro* para estudiar las respuestas fisiológicas a las hormonas. Después de un esfuerzo considerable, fue capaz de activar glucógeno fosforilasa en una preparación de células *rotas* que habían sido incubadas con glucagón o epinefrina. Esta preparación de célula-rota debió dividirse mediante centrifugación en una fracción particulada que constaba principalmente de membranas de células y una fracción sobrenadante. Aunque el glucó-

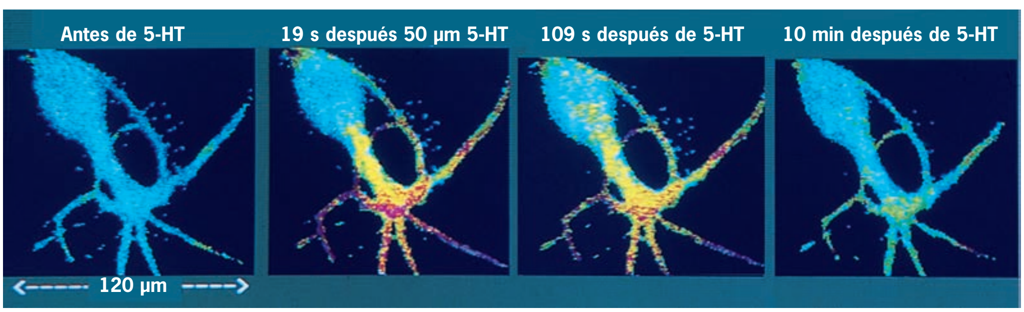



**FIGURA 15-8 La formación localizada de cAMP en una célula viva en respuesta a la adición de una molécula mensajera extracelular.** Esta serie de fotografías muestra una célula nerviosa sensorial de la liebre marina *Aplysia*. La concentración de cAMP libre se indica por color: azul representa una baja concentración de cAMP, amarillo una concentración intermedia, y rojo una concentración alta. La imagen de la izquierda muestra el nivel de cAMP intracelular en la neurona no estimulada, y las tres imágenes siguientes muestran los efectos de la estimulación por el neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina) en los momentos indicados. Se debe notar que los niveles de cAMP caen en 109 s a pesar de la presencia continua del neurotransmisor. (El nivel de cAMP se determinó indirectamente en este experimento mediante microinyección de una proteína cinasa dependiente de cAMP, marcada con fluoresceína y rodamina en diferentes subunidades. La transferencia de energía entre las subunidades (véase p. 697) proporciona una medida de la concentración de cAMP.)

FUENTE: Tomada de Brian J Bacskai, *et al*. *Science* 1993;260:223. Reproducido con permiso de AAAS.

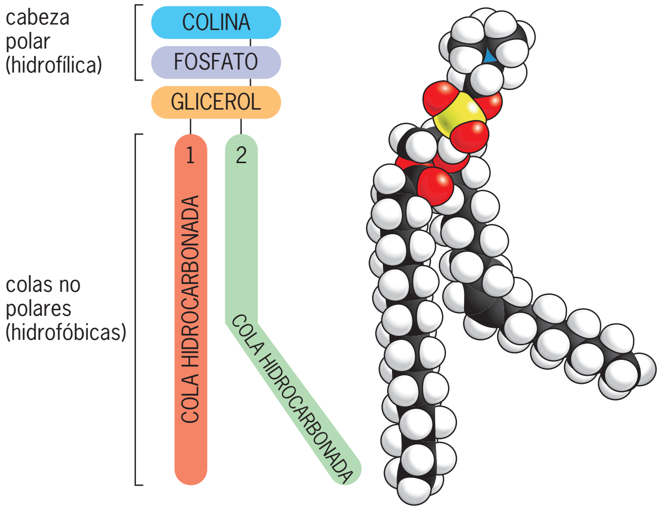
geno fosforilasa estaba presente sólo en la fracción sobrenadante, el material particulado se requirió para obtener la respuesta hormonal. Experimentos posteriores indicaron que la respuesta se produjo en al menos dos pasos distintos. Si la fracción particulada de un homogenado de hígado estaba aislada e incubada con la hormona, alguna sustancia fue liberada y, cuando se añadió a la fracción sobrenadante, activó las moléculas del glucógeno fosforilasa soluble. Sutherland identificó la sustancia liberada por las membranas de la fracción particulada como adenosín monofosfato cíclico (*AMP cíclico*, o simplemente *cAMP*, *cyclic adenosine monophosphate*). Este descubrimiento está proclamado como el comienzo del estudio de la transducción de señal. Como se discutirá después, el cAMP estimula la movilización de glucosa activando una proteína cinasa que agrega un grupo fosfato sobre un residuo específico de serina del polipéptido glucógeno fosforilasa.

## Segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol

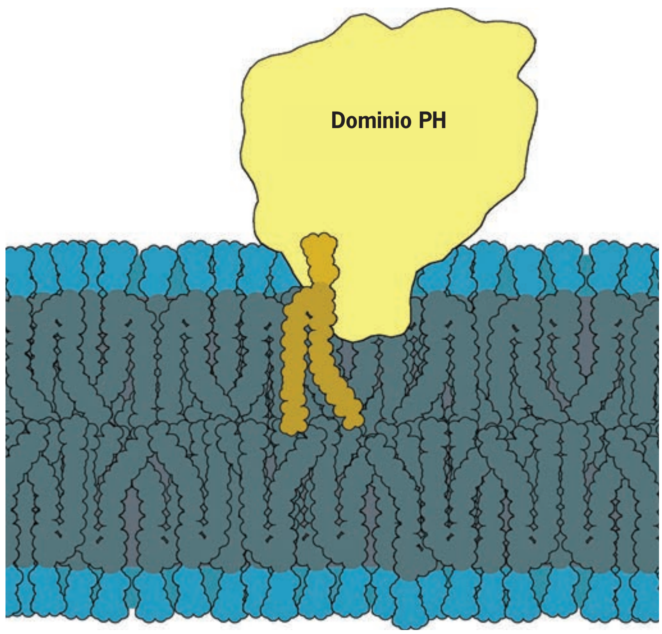
No fue hace mucho tiempo que los fosfolípidos de las membranas celulares se consideraron estrictamente como moléculas estructurales que hacen a las membranas cohesivas e impermeables a los solutos acuosos. La valoración de los fosfolípidos se ha incrementado al comprender que estas moléculas forman los precursores de varios segundos mensajeros. Los fosfolípidos de las membranas celulares se convierten en segundos mensajeros por una variedad de enzimas que están reguladas en respuesta a señales extracelulares. En estas enzimas se incluyen las fosfolipasas (enzimas que hidrolizan a los lípidos), las fosfolípidos cinasas (enzimas que fosforilan lípidos), y las fosfolípido fosfatasas (enzimas que desfosforilan lípidos). Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan uniones éster específicas que unen los diferentes bloques que forman una molécula de fosfolípido. La **FIGURA 15-9*a*)** muestra los sitios de escisión dentro de un fosfolípido que son atacados por las principales clases de fosfolipasas. Las cuatro clases de enzimas que se representan en la figura 15-9*a* se pueden activar en respuesta a señales extracelulares y sus productos funcionan como segundos mensajeros. Esta sección se enfocará en los segundos mensajeros lipídicos mejor estudiados, los cuales se derivan del fosfatidilinositol y se generan después de la transmisión de señales por los receptores acoplados a proteína G y el receptor de proteína-tirosina cinasas. No se discute otro grupo de segundos mensajeros lipídicos derivado de la esfingomielina.

Cuando el neurotransmisor acetilcolina se une a la superficie de una célula muscular lisa dentro de la pared del estómago, la célula muscular se estimula para contraerse. Cuando un antígeno extraño se une a la superficie de un mastocito, la célula se estimula para secretar histamina, una sustancia que puede desencadenar los síntomas de un ataque de alergia. Ambas respuestas, una que conduce a la contracción y otra a la secreción, se activan por el mismo segundo mensajero, una sustancia derivada del compuesto fosfatidil, un componente menor de la mayoría de las membranas celulares (véase figura 4-10).

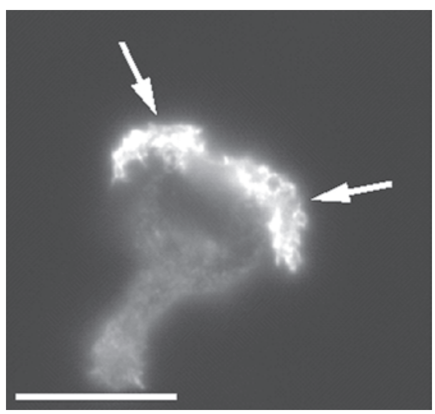
El primer indicio de que los fosfolípidos podrían estar involucrados en las respuestas celulares a señales extracelulares surgieron a partir de estudios a principios de la década de 1950, realiza-




*a*)




*b*)



*c*)

**FIGURA 15-9 Segundos mensajeros basados en fosfolípidos.** *a*) La estructura general de un fosfolípido (véase figura 2-22). Los fosfolípidos están sujetos al ataque por cuatro tipos de fosfolipasas que rompen la molécula en los sitios indicados. De estas enzimas, nos centraremos en la PLC, que hidroliza al grupo principal fosforilado del diacilglicerol (véase figura 15-10). *b*) Una ilustración que muestra la interacción entre un dominio PH que se une al anillo de inositol fosforilado de un fosfoinosítido. Esta interacción une la proteína a la superficie interna de la membrana plasmática y puede alterar la actividad de la proteína original. *c*) Fotografía de fluorescencia de una célula que se ha estimulado para moverse hacia un quimioatrayente (es decir, un químico al que la célula se siente atraída). Esta célula ha sido teñida con un anticuerpo que se une específicamente al PI 3,4,5-trifosfato (PIP, *PI 3,4,5 trisphosphate*), el cual se observa localizado en el borde anterior de la célula migratoria (flechas). La barra es igual a 15 µm.

FUENTE: *b*) De J Hurley y J Grobler. *Curr Opin Struct Biol* 1997;7:559 con el permiso de Elsevier. *c*) De Paula Rickert, *et al*. Cortesía de Henry R Bourne, Universidad de California, San Francisco. *Trends Cell Biol* 2000;10:470. Ambas imágenes.

dos por Lowell y Mabel Hokin del Hospital General de Montreal y la Universidad McGill. Estos investigadores comenzaron a estudiar los efectos de la acetilcolina sobre la síntesis del RNA en el páncreas. Para realizar los estudios, incubaron partes del páncreas de paloma en [$^{32}$P] ortofosfato. La idea era que el [$^{32}$P] ortofosfato se incorporaría a los nucleósidos trifosfatos, que se utilizan como precursores durante la síntesis del RNA. Curiosamente, encontraron que el tratamiento del tejido con la acetilcolina llevó a la incorporación de radiactividad dentro de la fracción fosfolipídica de la célula. Análisis posteriores revelaron que el isótopo se incorporó primeramente dentro del fosfatidilinositol (PI, *phosphatidylinositol*), el cual se convirtió rápidamente en otros derivados fosforilados, los cuales en conjunto se denominan **fosfoinosítidos.** Esto sugiere que los lípidos que contienen inositol pueden ser fosforilados por cinasas lipídicas específicas que se activan en respuesta a moléculas mensajeras extracelulares, como la acetilcolina. Ahora está bien establecido que las cinasas lipídicas se activan en respuesta a una variedad de señales extracelulares

Varias de las reacciones del metabolismo de los fosfoinosítidos se muestran en la **FIGURA 15-10**. Como se indica en el lado izquierdo de esta figura, el anillo de inositol, que reside en la superficie citoplásmica de la bicapa, tiene seis átomos de carbono. El carbono número 1 está involucrado en el enlace entre el inositol y el diacilglicerol. Los carbonos 3, 4 o 5 pueden ser fosforilados por cinasas de fosfoinosítidos específicas presentes en las células para generar 7 fosfoinosítidos distintos. Por ejemplo, la transferencia de un grupo fosfato a la posición 4 del azúcar inositol del PI por la cinasa 4 PI (PI4K, *PI 4-kinase*) genera fosfato 4 PI (PI(4)P, *PI 4phosphate*), que puede ser fosforilado por la cinasa 5 PIP (PIP5K, *PIP 5kinase*) para formar PI 4,5-bi fosfato (PI(4,5)$P_2$, *PI 4,5bisphosphate*); (figura 15-10, pasos 1 y 2). El PI (4,5)$P_2$ puede ser fosforilado por cinasa PI 3 (PI3K, *PI 3-kinase*) para formar PI(3,4,5)$P_3$ ($PIP_3$, *PI(3,4,5)$P_3$*) (se muestra en la figura 15-25*c*). La fosforilación de PI (4,5) $P_2$ para formar $PIP_3$ es de particular interés porque las enzimas PI3K involucradas en este proceso pueden ser controladas por una gran variedad de moléculas extracelulares y la hiperactividad de PI3K se ha asociado con los cánceres humanos. La formación de PIP3 durante la respuesta a la insulina se trata en la sección 15-12.

Todas las especies de fosfolípidos que se discutieron anteriormente permanecen en la lámina citoplásmica de la membrana plasmática; ellas son segundos mensajeros unidos a la membrana. Así como existen cinasas lipídicas para agregar grupos fosfato a los fosfoinosítidos, hay fosfatasas lipídicas (p. ej., PTEN) para eliminarlos. La actividad de estas cinasas y fosfatasas está coordinada, por tanto, los fosfoinosítidos específicos aparecen en compartimientos de membrana concretos en un tiempo determinado después que se ha recibido una señal. Las funciones de los fosfoinosítidos específicos en el transporte de membrana se discutieron en la página 296.

Los anillos de inositol fosforilados de fosfoinosítidos forman sitios de unión para varios dominios de unión de lípidos (PH, PX y FYVE) encontrados en las proteínas. El más conocido es el **dominio PH** (figura 15-9*b*), que ha sido identificado en más de 150 proteínas diferentes. La unión de una proteína por su dominio PH al PI (3, 4) $P_2$ o $PIP_3$ por lo general recluta a la proteína en la lámina citoplásmica de la membrana plasmática, donde puede interactuar con otras proteínas unidas a la membrana, incluidos los activadores, inhibidores o sustratos. La figura 15-9*c*) muestra un ejemplo donde $PIP_3$ se localiza específicamente en una porción particular de la membrana plasmática de una célula. La $PIP_3$ se produce en la parte frontal de la célula por una cinasa lipídica local y posteriormente se degrada en la parte posterior y a los lados de la célula por una fosfatasa lipídica local. La célula que se muestra en la figura 15-9*c*) se activa en la quimiotaxis, lo que quiere decir que se está moviendo hacia un aumento en la concentración de una sustancia química particular en el medio que sirve como quimioatrayente. Este es el mecanismo que provoca que las células fagocíticas como los macrófagos se muevan hacia las bacterias u otros blancos que engloban. La quimiotaxis depende de la producción localizada de los mensajeros fosfoinosítidos, los que se enlazan a ciertas proteínas de unión a actina (sección 9.13) que influyen en la formación de filamentos de actina y lamelipodio que son necesarios para el movimiento de la célula hacia el blanco.

## Fosfolipasa C

No todos los segundos mensajeros que contienen inositol permanecen en la bicapa lipídica de una membrana. Cuando la acetilcolina se une a una célula del músculo liso, o un antígeno se une a un mastocito, el receptor ligado activa una proteína G heterotrimérica (figura 15-10, paso 3), que a su vez activa al efector *fosfoli-*

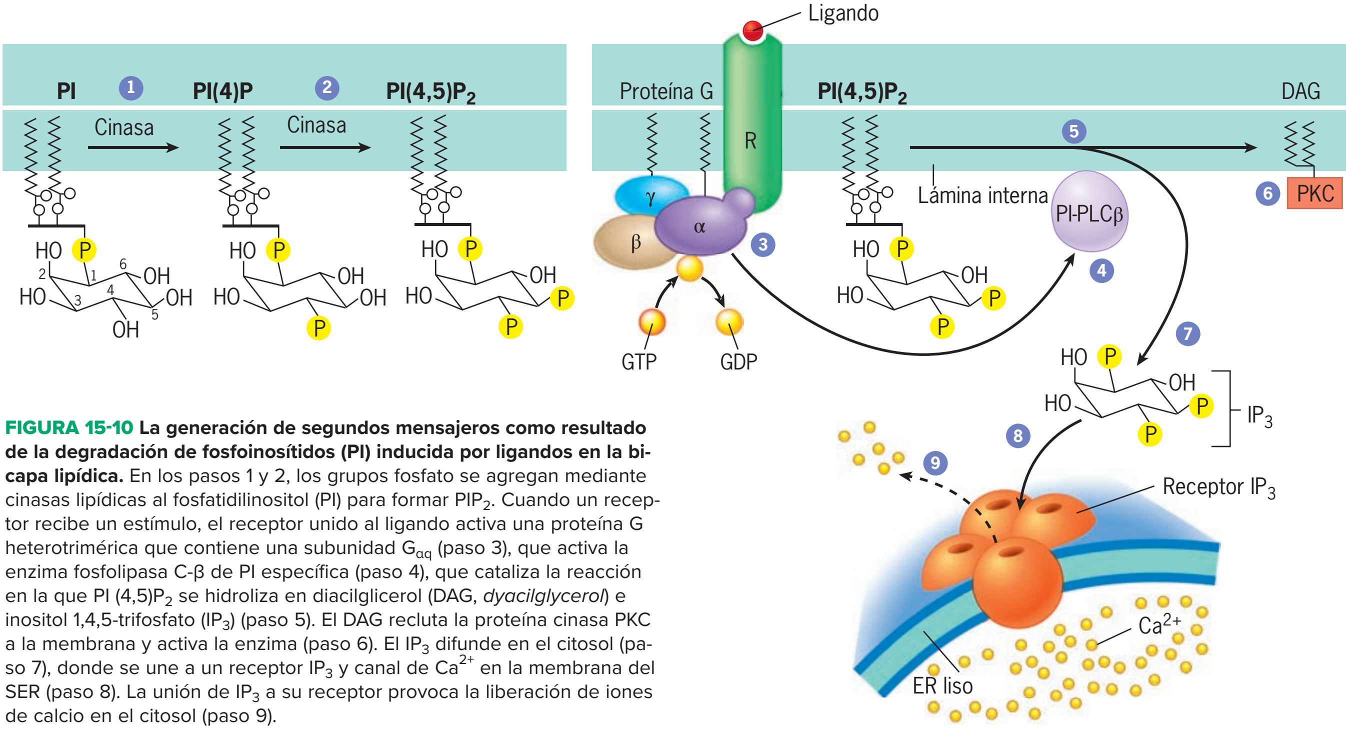



**FIGURA 15-10 La generación de segundos mensajeros como resultado de la degradación de fosfoinosítidos (PI) inducida por ligandos en la bicapa lipídica.** En los pasos 1 y 2, los grupos fosfato se agregan mediante cinasas lipídicas al fosfatidilinositol (PI) para formar $PIP_2$. Cuando un receptor recibe un estímulo, el receptor unido al ligando activa una proteína G heterotrimérica que contiene una subunidad $G_{\alpha q}$ (paso 3), que activa la enzima fosfolipasa C-β de PI específica (paso 4), que cataliza la reacción en la que PI (4,5)$P_2$ se hidroliza en diacilglicerol (DAG, *dyacilglycerol*) e inositol 1,4,5-trifosfato ($IP_3$) (paso 5). El DAG recluta la proteína cinasa PKC a la membrana y activa la enzima (paso 6). El $IP_3$ difunde en el citosol (paso 7), donde se une a un receptor $IP_3$ y canal de $Ca^{2+}$ en la membrana del SER (paso 8). La unión de $IP_3$ a su receptor provoca la liberación de iones de calcio en el citosol (paso 9).

*pasa específica de fosfatidilinositol* C-β(PLCβ, *phosphatidylinositol specific phospholipase β*) (paso 4). Al igual que la proteína representada en la figura 15-9*b*), la PLCβ se sitúa en la superficie interna de la membrana (figura 15-10), unida allí por la interacción entre su dominio PH y un fosfoinosítido insertado en la bicapa. La PLCβ cataliza una reacción que hidroliza el PI(4, 5)$P_2$ en dos moléculas, *inositol 1,4,5-trifosfato* (*$IP_3$*) y *diacilglicerol* (*DAG*) (paso 5, figura 15-10), ambas desempeñan funciones importantes como segundos mensajeros en la señalización celular. Se estudiarán cada uno de estos segundos mensajeros por separado.

**DIACILGLICEROL** El diacilglicerol (DAG, *diacylglycerol*, figura 15-10) es una molécula lipídica que permanece en la membrana plasmática después de su formación por PLCβ. Allí recluta y activa las proteínas efectoras que tienen un dominio C1 de unión al DAG. El mejor estudiado de estos factores es una familia de proteínas llamada *proteína cinasa C* (PKC, *protein kinase C*) (paso 6, figura 15-10), que fosforila residuos de serina y treonina en una amplia variedad de proteínas blanco.

Las isoformas de la proteína cinasa C tienen varias funciones importantes en el crecimiento y la diferenciación celular, el metabolismo, la muerte celular y las respuestas inmunitarias. La importancia aparente de la proteína cinasa C en el control del crecimiento se observa en estudios con un grupo de compuestos vegetales poderosos, llamados *ésteres de forbol*, que se parecen al DAG. Estos compuestos activan isoformas de proteínas cinasas C en varias células de cultivo, lo que provoca pérdida del control del crecimiento y se comportan temporalmente como células malignas. Cuando el éster de forbol se elimina del medio, las células recuperan sus propiedades para un crecimiento normal. Por el contrario, las células diseñadas genéticamente para expresar proteínas cinasas C constitutivas exhiben un fenotipo de malignidad permanente en células de cultivos y pueden causar cáncer en ratones susceptibles. La importancia de la PKC en el desarrollo de la respuesta inmunitaria se ha visto en estudios de un inhibidor específico de las PKC llamado AEB071, el cual se ha empezado a estudiar en investigaciones clínicas como un inmunosupresor para prevenir el rechazo del trasplante de riñón y en el tratamiento de la psoriasis.

**1,4,5-TRIFOSFATO DE INOSITOL ($IP_3$)** El 1,4,5 trifosfato de inositol es un azúcar fosfato, una pequeña molécula soluble en agua capaz de una rápida difusión en todo el interior de la célula. Las moléculas de $IP_3$ formadas en la membrana se difunden en el citosol (paso 7, figura 15-10) y se unen a un receptor de $IP_3$ específico localizado en la superficie del retículo endoplasmático liso (paso 8). Se indicó en la sección 8.3 que el retículo endoplásmico liso es un sitio de almacenamiento de calcio en una variedad de células. El receptor $IP_3$ también funciona como un canal tetramérico de $Ca^{2+}$. La unión de $IP_3$ abre el canal, lo cual permite que los iones de $Ca^{2+}$ se difundan en el citoplasma (paso 9). Los iones de calcio también pueden considerarse como intracelulares o segundos mensajeros porque se unen a varias moléculas blanco, lo que desencadena respuestas específicas. En los dos ejemplos utilizados anteriormente, la contracción de una célula muscular lisa y la exocitosis de la histamina de los mastocitos que contiene gránulos secretores se desencadenan por la elevación de los niveles de calcio. También es la respuesta de una célula del hígado a la hormona vasopresina (la misma hormona que tiene actividad antidiurética en el riñón, p. 142). La vasopresina se une a sus receptores en la superficie de las células del hígado y causa una serie de funciones de $IP_3$ mediadas por liberación de $Ca^{2+}$, que aparecen como oscilaciones del calcio citosólico libre en el registro que se muestra en la **FIGURA 15-11**. La frecuencia y la intensidad de tales oscilaciones pueden codificar información que rige la respuesta específica de la célula. Una lista de algunas de las respuestas mediadas por $IP_3$ se indica en la tabla 15-2. En la sección 15-14 se discutirá más sobre los iones $Ca^{2+}$.

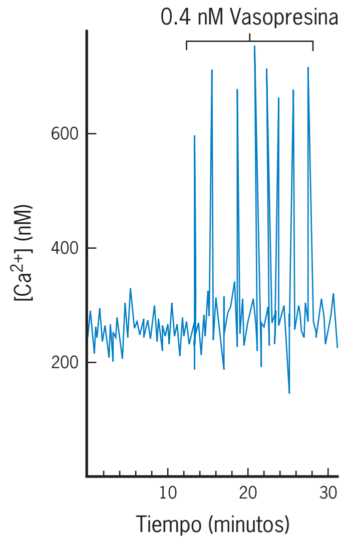



**FIGURA 15-11 Demostración experimental de cambios en la concentración de calcio libre en respuesta a la estimulación hormonal.** Una célula hepática se inyectaba con aequorina, una proteína que se extrae de ciertas medusas que alumbran cuando se unen a los iones de calcio. La intensidad de la luminiscencia es proporcional a la concentración de iones de calcio libres. La exposición de la célula a la vasopresina conduce a picos controlados en la concentración de calcio libre a intervalos periódicos. Las concentraciones más altas de la hormona no aumentan la altura (amplitud) de los picos, pero incrementan su frecuencia.

FUENTE: Reproducido con permiso de NM Woods, KS Cuthbertson, y PH Cobbold. *Nature* 1986;319:601; copyright 1986. *Nature* por Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

**TABLA 15-2 Resumen de las respuestas celulares obtenidas al agregar $IP_3$ ya sea a células permeabilizadas o intactas**

| Tipo de célula | Respuesta |
|---|---|
| Músculo liso vascular | Contracción |
| Músculo liso del estómago | Contracción |
| Moldes de limo | Formación de GMP cíclico, polimerización de la actina |
| Plaquetas sanguíneas | Cambio de forma, agregación |
| Bastones de la salamandra | Modulación de la respuesta a la luz |
| Ovocitos de *Xenopus* | Movilización de calcio, despolarización de la membrana |
| Huevos de erizos de mar | Despolarización de la membrana, reacción cortical |
| Glándula lagrimal | Aumento de la corriente de potasio |

Adaptado de MJ Berridge, reproducido con permiso del *Annual Review of Biochemistry* 1987(56), copyright 1987, *Annual Review of Biochemistry* (56), copyright 1987 por Richardson, Charles C. Reproducido con permiso de Annual Reviews, incorporado en el formato de reutilización en un libro a través de Copyright Clearance Center.

## REPASO

1. Describa el experimento de Sutherland que condujo al concepto del segundo mensajero.
2. ¿Cuál es el mecanismo de formación del segundo mensajero $IP_3$? ¿Cuál es la relación entre la formación de $IP_3$ y una elevación intracelular de [$Ca^{2+}$]?
3. Describa la relación entre el fosfatidilinositol, el diacilglicerol, los iones de calcio y la proteína cinasa C. ¿Cómo interfieren los ésteres de forbol con vías de señal que involucran DAG?

## 15.7 La especificidad de las respuestas acopladas a proteínas G

Una amplia variedad de agentes, que incluye hormonas, neurotransmisores y estímulos sensoriales, actúan a través de los GPCR y proteínas G heterotriméricas para transmitir información a través de la membrana plasmática, desencadenando una amplia variedad de respuestas celulares. Por tanto, los GPCR como grupo son capaces de unir un diverso conjunto de ligandos. Además, el receptor para un ligando dado puede existir en diferentes versiones (isoformas). Por ejemplo, los investigadores han identificado nueve isoformas diferentes del receptor adrenérgico, al cual se une la epinefrina, y 15 isoformas diferentes del receptor para la serotonina, un poderoso neurotransmisor liberado por las células nerviosas en algunas partes del cerebro. Las diferentes isoformas pueden tener distintas afinidades para el ligando o pueden interactuar con diversos tipos de proteínas G. Las diferentes isoformas de un receptor pueden coexistir en la misma membrana plasmática, o pueden aparecer en las membranas de diferentes tipos de células blanco. Las proteínas G heterotriméricas que transmiten señales desde el receptor al efector pueden existir en múltiples formas, como pueden existir muchos de los efectores. El genoma humano codifica al menos 16 diferentes subunidades $G_\alpha$, cinco diferentes subunidades $G_\beta$, y 11 diferentes subunidades $G_\gamma$, junto con nueve isoformas del efector adenil ciclasa. Diferentes combinaciones de subunidades específicas forman proteínas G que tienen diferentes capacidades de reacción con isoformas específicas de receptores y de efectores.

Como se menciona en la página 589, algunas proteínas G actúan inhibiendo sus efectores. El mismo estímulo puede activar una proteína G estimuladora (una con la subunidad $G_{\alpha s}$) en una célula y una proteína G inhibitoria (uno con una subunidad $G_{\alpha i}$) en una célula diferente. Por ejemplo, cuando la epinefrina se une a un receptor betaadrenérgico en una célula del músculo cardiaco, una proteína con una subunidad $G_{\alpha s}$ se activa, estimula la producción de cAMP, lo que conduce a un aumento en la frecuencia y la fuerza de contracción. Por el contrario, cuando la epinefrina se une a un receptor adrenérgico en una célula muscular lisa en el intestino, se activa una proteína G con una subunidad $G_{\alpha i}$, que inhibe la producción de cAMP, produciendo relajación muscular. Finalmente, algunos receptores adrenérgicos estimulan las proteínas G con las subunidades $G_{\alpha q}$, lo que conduce a la activación del PLCβ. De manera que los mismos mensajeros extracelulares pueden activar varias vías en diferentes células.

**REPASO**

1. Describa las formas en que un solo ligando de GPCR puede efectuar una variación de las respuestas en diferentes células.

## 15.8 Regulación de los niveles de glucosa en sangre

La glucosa puede utilizarse como fuente de energía en casi todos los tipos de células presentes en el cuerpo. Se oxida a $CO_2$ y $H_2O$ mediante la glucólisis y el ciclo del TCA, proporcionando a las células ATP que se puede usar para conducir reacciones energéticas, las cuales requieren de energía. El cuerpo mantiene los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo dentro de un rango estrecho. Como se discutió en el capítulo 3, el exceso de glucosa se almacena en las células de los animales como glucógeno, un gran polímero ramificado compuesto de monómeros de glucosa que están unidos por enlaces glucosídicos. La hormona glucagón se produce por las alfacélulas del páncreas en respuesta a niveles bajos de glucosa en la sangre. El glucagón estimula la descomposición del glucógeno y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo, lo cual provoca un aumento de los niveles de glucosa. La hormona insulina se produce por las betacélulas del páncreas en respuesta a los altos niveles de glucosa y estimula la captación de glucosa y el almacenamiento como glucógeno. Finalmente, la epinefrina, que a veces se denomina hormona de "lucha o huida", se produce por la glándula suprarrenal en situaciones de estrés. La epinefrina causa un aumento en los niveles de glucosa en la sangre para proporcionar al cuerpo los recursos energéticos adicionales necesarios para superar la situación estresante que afronta.

La insulina actúa a través de un receptor de proteína-tirosina cinasa y su transducción de señal se discute en la sección 15.12. Por el contrario, tanto el glucagón como la epinefrina actúan uniéndose a los GPCR. El glucagón es una proteína pequeña que se compone de 29 aminoácidos, mientras que la epinefrina es una pequeña molécula que se deriva del aminoácido tirosina. Estructuralmente hablando, estas dos moléculas no tienen nada en común, aunque se unen a los GPCR y estimulan la descomposición del glucógeno en glucosa 1-fosfato (**FIGURA 15-12**). Además, la unión de cualquiera de estas hormonas conduce a la inhibición de la enzima glucógeno sintasa, la cual cataliza la reacción opuesta en la que se añaden unidades de glucosa a moléculas de glucógeno en crecimiento. Estos dos estímulos diferentes (el glucagón y la epinefrina), reconocidos por diferentes receptores, inducen a la misma respuesta en una sola célula blanco. Los dos receptores difieren uno de otro principalmente en la estructura del bolsillo de unión del ligando en la superficie extracelular de la célula, el cual es específico para una u otra hormona. Luego de la activación por sus respectivos ligandos, ambos receptores activan el mismo tipo de proteínas G heterotriméricas que provoca un incremento en los niveles de cAMP.

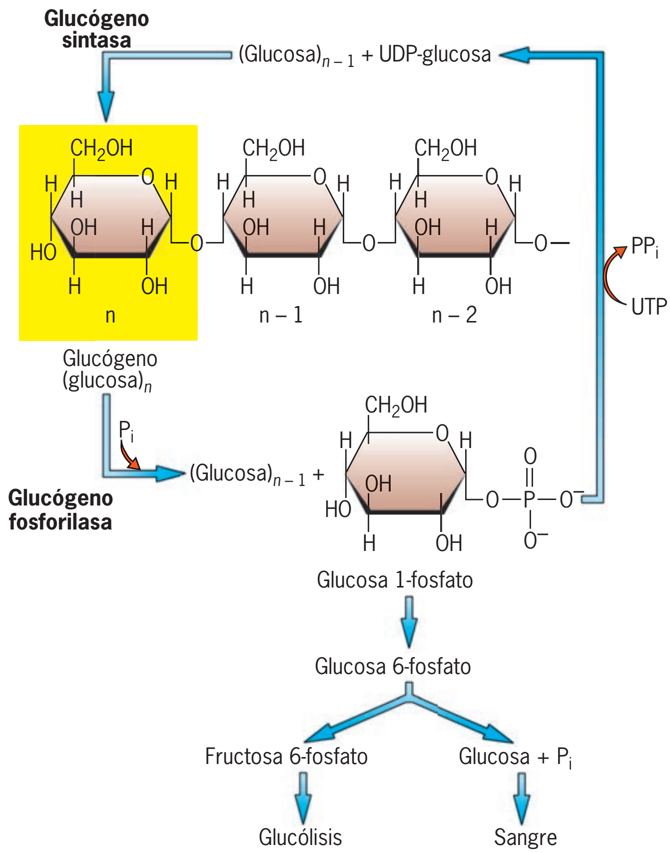



**FIGURA 15-12 Las reacciones que conducen al almacenamiento o movilización de la glucosa.** Las actividades de dos de las enzimas clave en estas reacciones, la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa están controladas por hormonas que actúan a través de vías de transducción de señales. La glucógeno fosforilasa se activa en respuesta al glucagón y la epinefrina, mientras que la glucógeno sintasa se activa en respuesta a la insulina (sección 15.12).

## Movilización de la glucosa: un ejemplo de una respuesta inducida por cAMP



El cAMP se sintetiza por la adenilil ciclasa, una proteína integral de membrana cuyo dominio catalítico reside en la superficie interna de la membrana plasmática (**FIGURA 15-13**). El cAMP evoca una respuesta que conduce a la movilización de glucosa, lo cual inicia una cadena de reacciones, como se ilustra en la **FIGURA 15-14**. El primer paso en esta *reacción en cascada* ocurre cuando la hormona se une a su receptor, activando una subunidad $G_{\alpha s}$, que activa un efector de adenilil ciclasa. La enzima activada cataliza la formación de cAMP (pasos 1 y 2, figura 15-14).

Las moléculas de cAMP una vez formadas, se difunden en el citoplasma donde se unen a un sitio alostérico en una subunidad reguladora de un proteína cinasa dependiente de cAMP [*proteína cinasa A*, PKA (*protein kinase A*)] (paso 3, figura 15-14). En su forma inactiva, la PKA es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). Las subunidades reguladoras normalmente inhiben la actividad catalítica de la enzima. La unión del cAMP provoca la disociación de las subunidades reguladoras, de este modo libera las subunidades catalíticas activas de la PKA. Los sustratos blanco de PKA en las células del hígado incluye dos enzimas que cumplen una función central en el metabolismo de la glucosa, la glucógeno sintasa y la fosforilasa cinasa (pasos 4 y 5). La fosforilación de la glucógeno sintasa inhibe su actividad catalítica y así previene la conversión de glucosa a glucógeno. Por el contrario la fosforilación de la fosforilasa cinasa activa la enzima que cataliza la transferencia de grupos fosfato a las moléculas de la glucógeno fosforilasa. Como descubrieron Krebs y Fischer (p. 173), la adición de un grupo fosfato a un residuo específico de serina en el polipéptido de la glucógeno fosforilasa, activa esta enzima (paso 6), estimulando la rotura del glucógeno (paso 7). La glucosa 1-fosfato que se forma en la reacción se convierte en glucosa, la cual se difunde hacia el torrente sanguíneo y así alcanza otros tejidos del cuerpo (paso 8).

Como cabría esperar, debe existir un mecanismo para revertir los pasos que se discuten antes; de lo contrario, la célula permanecería en el estado activo indefinidamente. Las células del hígado contienen fosfatasas que retiran grupos fosfato adicionados por las cinasas. Un particular miembro de esta familia de enzimas, la proteína fosfatasa 1, puede retirar fosfatos de todas las enzimas fosforiladas, en la figura 15-14: cinasa fosforilasa, glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. La destrucción de las moléculas de cAMP presentes en la célula se efectúa por la enzima cAMP fosfodiesterasa, la cual ayuda a terminar la respuesta.

## Amplificación de señal

La unión de una molécula hormonal en la superficie celular puede activar un número de proteínas G, cada una de las cuales puede activar un efector adenilil ciclasa, cada uno de ellos puede producir una gran cantidad de cAMP mensajeros en un corto periodo. Por tanto, la producción de un segundo mensajero proporciona un mecanismo para amplificar bastante la señal que se genera del mensaje original. Muchos de los pasos en la reacción en cascada ilustrados en la figura 15-14 resultan en la amplificación de la señal (estos pasos se indican por las flechas azules). Las moléculas de cAMP activan la PKA. Cada subunidad catalítica de la PKA fosforila un gran número de moléculas de fosforilasa cinasa, que a su vez fosforila un número incluso más grande de moléculas de glucógeno fosforilasa, y al mismo tiempo puede catalizar la formación de un mayor número de glucosa fosfatos. Por tanto, lo que comienza como apenas un estímulo perceptible en la superficie celular, se transforma rápidamente en la principal movilización de glucosa dentro de la célula.

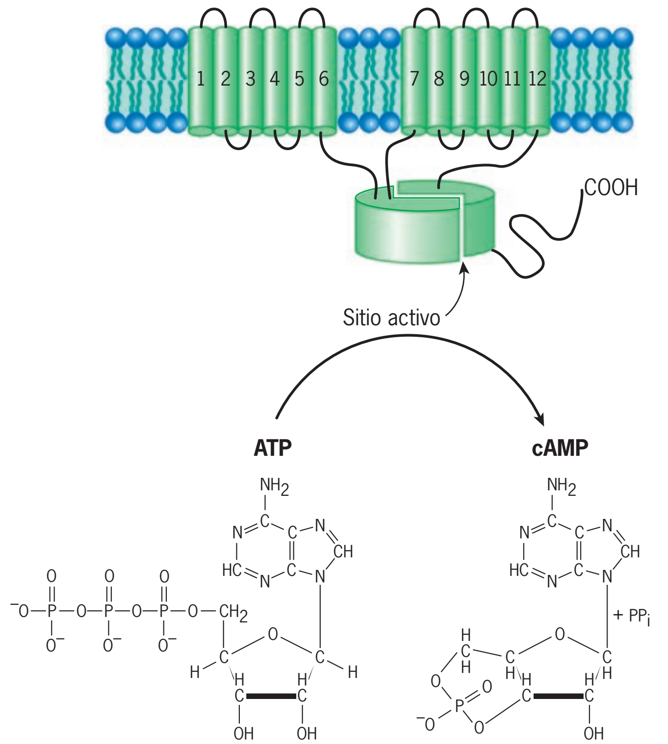



**FIGURA 15-13 La formación de AMP cíclico a partir de ATP está catalizada por la adenilil ciclasa, una proteína integral de membrana que consta de dos partes, cada una contiene seis hélices transmembrana (se muestra aquí en dos dimensiones).** El sitio activo de la enzima se ubica en la superficie interna de la membrana en una hendidura situada entre dos dominios citoplásmicos similares. La rotura del cAMP (no se muestra) se logra mediante una fosfodiesterasa que convierte el nucleótido cíclico en un 5′ monofosfato.

## Otros aspectos de las vías de transducción de señal del cAMP

Aunque los efectos más rápidos y mejor estudiados del cAMP se producen en el citoplasma, el núcleo y sus genes también participan en la respuesta. Una fracción de las moléculas de PKA activadas se translocan dentro del núcleo donde fosforilan proteínas nucleares clave (paso 9, figura 15-14), el más importante factor de transcripción llamado proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP (CREB, *cAMP response element binding protein*). La versión fosforilada CREB se une como un dímero a los sitios en el DNA (figura 15-14, paso 10) que contiene una secuencia de nucleótidos específica (TGACGTCA), conocido como *elemento de respuesta a cAMP* (CRE, *cAMP response element*). Se debe recordar de la sección 12.13 que los elementos de respuesta son sitios en el DNA donde los factores de transcripción se unen e incrementan la tasa de iniciación de la transcripción. Los CRE están situados en las regiones reguladoras de genes que cumplen una función en la respuesta al cAMP. En las células del hígado, por ejemplo, varias enzimas involucradas en la gluconeogénesis, una vía por la cual se forma glucosa a partir de los intermediarios de la glucólisis (véase figura 3-31), se codifican por genes que contienen CRE cercanos. Por tanto, la epinefrina y el glucagón no sólo activan enzimas catabólicas involucradas en la rotura del glucógeno, también promueven la síntesis de las enzimas anabólicas necesarias para sintetizar glucosa a partir de precursores menores.

El cAMP se produce en muchas células diferentes en respuesta a una amplia variedad de ligandos. Muchas de las respuestas hormonales mediadas por cAMP en las células de los mamíferos se enumeran en la tabla 15-3. Las vías del AMP cíclico se han implicado en procesos que ocurren en el sistema nervioso, que incluye el aprendizaje, la memoria y la adicción a las drogas. El

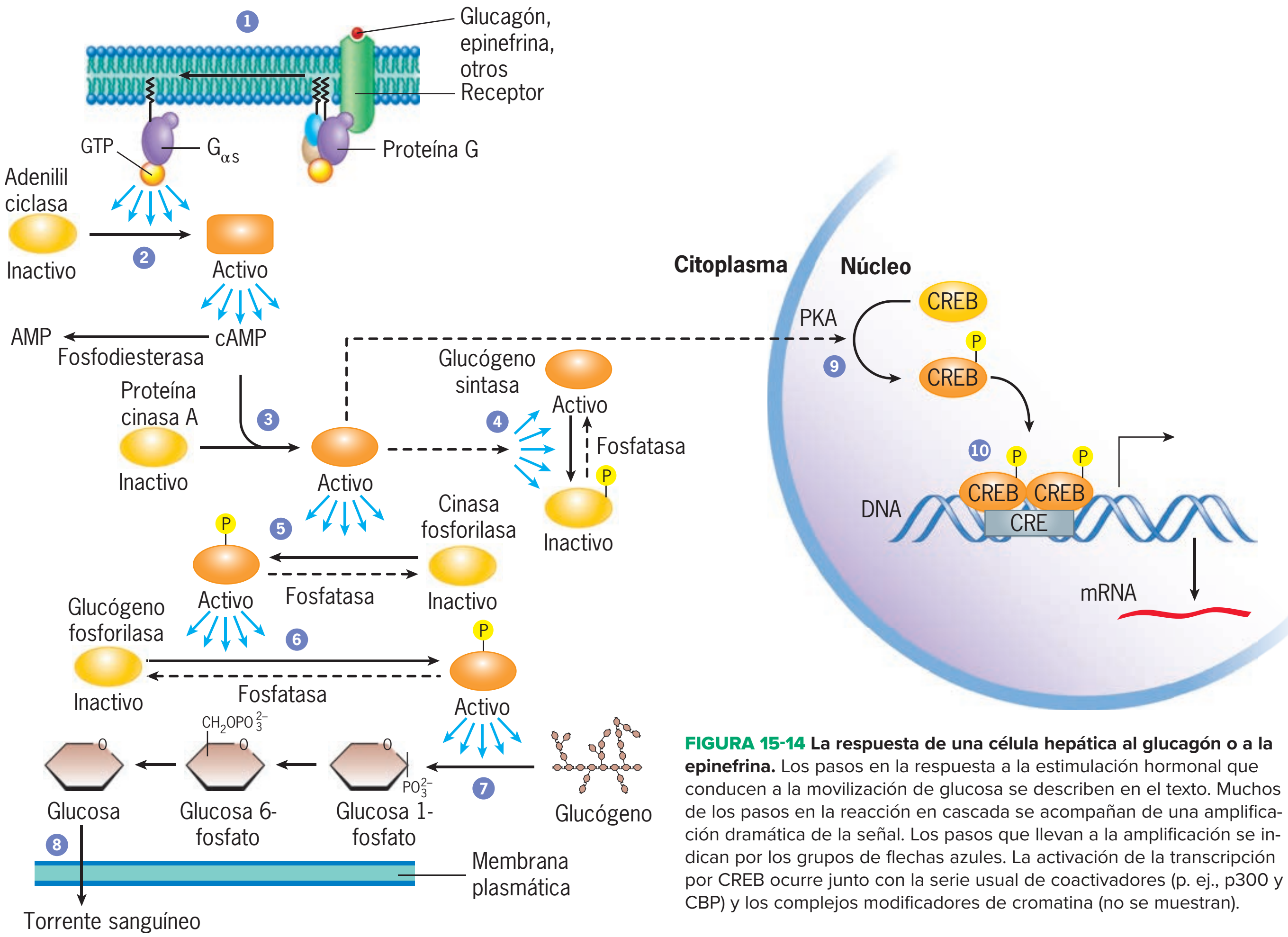



**FIGURA 15-14 La respuesta de una célula hepática al glucagón o a la epinefrina.** Los pasos en la respuesta a la estimulación hormonal que conducen a la movilización de glucosa se describen en el texto. Muchos de los pasos en la reacción en cascada se acompañan de una amplificación dramática de la señal. Los pasos que llevan a la amplificación se indican por los grupos de flechas azules. La activación de la transcripción por CREB ocurre junto con la serie usual de coactivadores (p. ej., p300 y CBP) y los complejos modificadores de cromatina (no se muestran).

uso crónico de opiáceos, por ejemplo, conduce a niveles elevados de adenilil ciclasa y PKA, que pueden ser responsables de forma parcial de la respuesta fisiológica que aparece durante la abstinencia a la droga. Otro nucleótido cíclico, GMP cíclico, también actúa como un segundo mensajero en ciertas células como se ilustró en la relajación inducida de las células del músculo liso discutida en la sección 15.16. Como se analiza en la siguiente sección, el GMP cíclico también cumple una función clave en la vía de señalización involucrada en la visión.

Debido a que el cAMP ejerce la mayoría de sus efectos activando a la PKA, la respuesta de una célula dada al cAMP está determinada típicamente por las proteínas específicas fosforiladas por esta cinasa (**FIGURA 15-15**). Aunque la activación de la PKA en una célula hepática en respuesta a la epinefrina conduce a la rotura del glucógeno, la activación de la misma enzima en una célula del túbulo renal en respuesta a la vasopresina causa un aumento en la permeabilidad de la membrana al agua, y la activación de la enzima en una célula tiroidea en respuesta a la TSH conduce a la secreción de la hormona tiroidea. Es evidente que la PKA debe fosforilar diferentes sustratos en cada uno de estos tipos celulares, vinculando así el aumento de los niveles de cAMP inducidos por la epinefrina, la vasopresina y la TSH a diferentes respuestas fisiológicas.

Se han descrito más de cien sustratos de PKA. La mayoría de estos lleva a cabo diferentes funciones, lo cual plantea la cuestión de cómo la PKA fosforila los sustratos apropiados en respuesta a un estímulo específico, en un tipo de célula particular. Esta pregunta se respondió en parte por la observación de que las diferentes células expresan distintos sustratos de la PKA y por el descubrimiento de las proteínas de anclaje a PKA o *AKAP* (*PKA anchoring proteins*), las cuales funcionan como centros de señalización. Las primeras AKAP se descubrieron como proteínas que se purificaron con PKA. Se han descubierto al menos 50 AKAP diferentes, varias de las cuales se muestran en la **FIGURA 15-16**. Como se indica en esta figura, las AKAP proporcionan un marco estructu-

**TABLA 15-3 Ejemplos de respuestas inducidas por hormonas mediadas por cAMP**

| Tejido | Hormona | Respuesta |
|---|---|---|
| Hígado | Epinefrina y glucagón | Rotura del glucógeno, síntesis de glucosa (gluconeogénesis), inhibición de la síntesis de glucógeno |
| Músculo esquelético | Epinefrina | Rotura del glucógeno, inhibición de la síntesis de glucógeno |
| Músculo cardiaco | Epinefrina | Aumento de la contractilidad |
| Tejido adiposo | Epinefrina, ACTH, y glucagón | Catabolismo de triacilglicerol |
| Riñón | Vasopresina (ADH) | Aumenta la permeabilidad de las células epiteliales para el agua |
| Tiroides | TSH | Secreción de hormonas tiroideas |
| Hueso | Hormona paratiroidea | Aumento de la reabsorción de calcio |
| Ovario | LH | Aumento de la secreción de hormonas esteroideas |
| Corteza suprarrenal | ACTH | Aumento de la secreción de glucocorticoides |

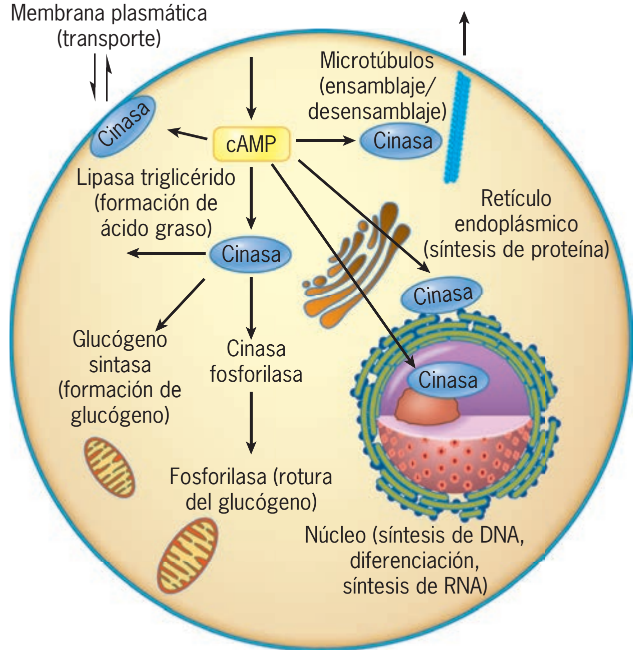



**FIGURA 15-15 Ilustración esquemática de la variedad de procesos que pueden verse afectados por los cambios en la concentración de cAMP.** Se cree que todos estos efectos están mediados por la activación de la misma enzima, la proteína cinasa A. De hecho, la misma hormona puede provocar respuestas muy diferentes en distintas células, incluso cuando se une al mismo receptor. La epinefrina, por ejemplo, se une a un receptor adrenérgico similar en las células hepáticas, grasas y musculares lisas del intestino, lo cual origina la producción de cAMP en los tres tipos celulares. Las respuestas, sin embargo, son bastante diferentes: el glucógeno se rompe en la célula hepática, los triacilgliceroles se descomponen en la célula adiposa y las células del músculo liso se relajan. Además de PKA, se sabe que cAMP interactúa con los canales iónicos, las fosfodiesterasas y GEF (p. 608).

ral o *andamio* para coordinar las interacciones proteína-proteína secuestrando PKA a ubicaciones específicas dentro de la célula. Como consecuencia, la PKA se acumula muy cerca de uno o más sustratos. Cuando los niveles de cAMP se elevan y la PKA se activa, los sustratos relevantes se acercan y son los primeros en fosforilarse. En parte, la selección del sustrato es una consecuencia de la localización subcelular de PKA en presencia de sustratos específicos. Diferentes células expresan distintas AKAP, lo que resulta en la localización de PKA en presencia de diferentes sustratos, y como consecuencia la fosforilación de distintos sustratos después del incremento de los niveles de cAMP. Es interesante considerar que, a diferencia de muchas proteínas con similar función, las AKAP tienen una estructura diversa, lo que sugiere que la evolución se ha apropiado de una variedad de diferentes tipos de proteínas al realizar una función similar en la señalización celular.

## REPASO

1. ¿Qué significa el término *amplificación* con respecto a la transducción de señal? ¿Cómo funciona la reacción en cascada resultado de la amplificación de una señal? ¿Cómo aumenta las posibilidades de la regulación metabólica?
2. ¿Cómo es posible que el mismo primer mensajero, como la epinefrina, pueda evocar diferentes respuestas en diversas células blanco?, ¿cómo el mismo segundo mensajero, como el cAMP, también puede evocar diferentes respuestas en distintas células blanco?, ¿cómo la misma respuesta, como la rotura del glucógeno, puede ser iniciada por diferentes estímulos?
3. Describa los pasos que conducen desde la síntesis de cAMP en la superficie interna de la membrana plasmática de una célula del hígado a la liberación de glucosa en la sangre. ¿Cómo se controla este proceso por GRK y las arrestinas; por las proteínas fosfatasas y las arrestinas; por las proteínas fosfatasas, y por cAMP fosfodiesterasa?

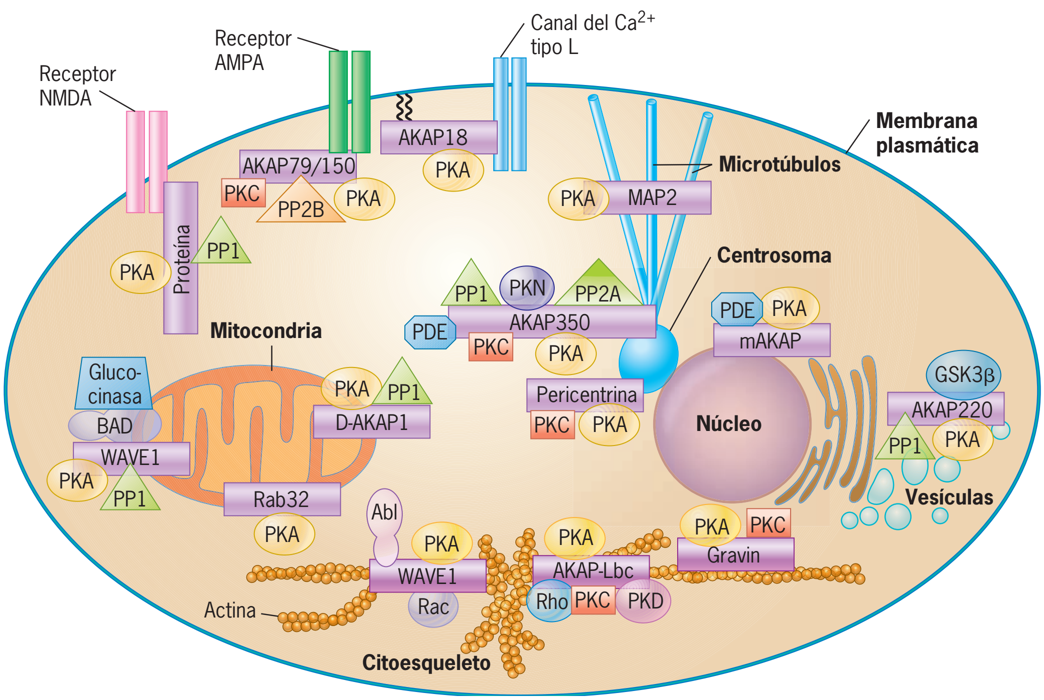



**FIGURA 15-16 Representación esquemática de los complejos de señalización AKAP que operan en compartimientos subcelulares diferentes.** La AKAP en cada uno de estos complejos de proteínas está representada por la barra de color púrpura. En cada caso, la AKAP forma un andamio que reúne una molécula de PKA con sustratos potenciales y otras proteínas implicadas en la vía de señalización, incluidas las fosfatasas (triángulos verdes) que pueden eliminar los grupos de fosfato añadidos y fosfodiesterasas que pueden interrumpir la señalización continua. Las AKAP que se muestran se dirigen a la PKA y a varios compartimientos diferentes, que incluyen la membrana plasmática, la mitocondria, el citoesqueleto, el centrosoma y el núcleo.

FUENTE: Reproducido con permiso de W Wong y JD Scott. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2004;5:961; copyright 2004. Nature Reviews Molecular Cell Biology por Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center

## 15.9 La función de los GPCR en la percepción sensorial

Nuestra capacidad de ver, degustar y oler depende en gran medida de los GPCR. Se mencionó anteriormente que la rodopsina, cuya estructura y activación se representa en la figura 15-5*b*, es un GPCR. La rodopsina es una proteína sensible a la luz presente en los bastones de nuestra retina, que son las células fotorreceptoras, las cuales responden a la luz de baja intensidad y nos proporcionan una imagen en blanco y negro de nuestro entorno por la noche o en una habitación oscura. Varios GPCR estrechamente relacionados están presentes en los conos de la retina, que nos proporcionan visión de color bajo condiciones de luz más brillante. La absorción de un fotón de luz induce un cambio de conformación en la molécula de rodopsina, que transmite una señal a una proteína G heterotrimérica (llamada *transducina*), la cual activa un efector de acoplado. El efector en este caso es la enzima cGMP fosfodiesterasa, que hidroliza el nucleótido cíclico cGMP, un segundo mensajero similar en estructura a cAMP (figura 15-13). El cGMP cumple una importante función en la excitación visual de las células bastones en la retina. En la oscuridad, los niveles de cGMP permanecen altos y así son capaces de unirse a los canales de sodio activados por cGMP en la membrana plasmática, manteniendo los canales en una configuración abierta, lo cual provoca la entrada de una corriente iónica continua ("corriente oscura"). La activación de cGMP fosfodiesterasa resulta en bajos niveles de cGMP, lo que conduce al cierre de los canales del sodio. Esta respuesta, que es raro que se dispare por una disminución en la concentración de un segundo mensajero, ocasiona la generación de potenciales de acción a lo largo del nervio óptico.

Nuestro sentido del olfato depende de los impulsos nerviosos transmitidos a lo largo de neuronas olfativas, las cuales se extienden desde el epitelio que recubre nuestra cavidad nasal superior al bulbo olfatorio ubicado en nuestro tallo cerebral. El extremo distal de estas neuronas, que se encuentran en el epitelio nasal, contienen *receptores olfativos*, que son GPCR capaces de fijar varios químicos que entran en nuestra nariz. Los receptores odorantes de los mamíferos se identificaron por primera vez en 1991 por Linda Buck y Richard Axel de la Universidad de Columbia. Se estima que los humanos expresan aproximadamente 400 diferentes receptores odorantes que, en conjunto, son capaces de combinar una gran variedad de diferentes estructuras químicas (odorantes).[1] Cada neurona receptora olfativa expresa sólo un alelo de uno de los cientos de diferentes genes de receptores odorantes. En consecuencia, cada una de estas neuronas sensoriales contiene sólo un receptor odorante específico, y sólo es capaz de responder a uno o algunos químicos relacionados. Como resultado, la activación de diferentes neuronas que contienen diferentes odorantes receptores nos proporciona la percepción de distintos aromas. Eso no significa que un solo producto químico no puede interactuar con más de un receptor olfativo, sino que la combinación específica de los receptores que se activan por ese compuesto puede desempeñar una función clave al producir un olor particular. Las mutaciones en un gen específico que codifica un receptor odorante particular puede dejar a una persona con la incapacidad de detectar un químico particular en su entorno que la mayoría de los otros miembros de la población puede percibir. Cuando los receptores odorantes se activan por la unión de ligandos, la señal va a través de las proteínas G heterotriméricas hasta la adenilil ciclasa, lo que resulta en la síntesis de cAMP y la abertura de un canal de catión activado por cAMP. Esta respuesta conduce a la generación de potenciales de acción que se transmiten al cerebro.

Nuestra percepción del gusto es mucho menos discriminativa que la percepción del olfato. Cada célula receptora del sabor en la lengua transmite una de las cinco cualidades básicas del sabor, es decir: salado, agrio, dulce, amargo, o umami (de la palabra japonesa que significa "sabroso"). Las células receptoras del sabor que producen el sabor del umami responden a los aminoácidos aspartato y glutamato y a los nucleótidos de purina, generando una percepción de que el alimento es "sabroso". Esta es la razón por la cual se le agrega glutamato monosódico y guanilato disódico a los alimentos procesados para realzar su sabor. El sabor placentero del umami se piensa que haya evolucionado como un mecanismo para conducir a los mamíferos a obtener alimentos ricos en proteínas. La percepción de que un alimento o bebida es salado o agrio se atribuye directamente a los iones de sodio o protones en los alimentos. Estos iones pasan a través de la membrana plasmática de las células receptoras por los canales de $Na^+$ o $H^+$ respectivamente, y de manera eventual conducen a la despolarización de las membranas plasmáticas de las células (sección 4.16). En contraste, la percepción de que el alimento es amargo, dulce o sabroso, depende de la interacción del compuesto con un GPCR en la superficie de la célula receptora. Los humanos codifican una familia de alrededor de 30 receptores del sabor amargo llamados T2R, que se acoplan a la misma proteína G heterotrimérica. Como grupo, estos receptores del gusto unen diversos compuestos, incluso plantas alcaloides o cianuros, que evocan un gusto amargo en nuestras bocas. Casi siempre las sustancias que evocan esta percepción son compuestos tóxicos que emiten una respuesta protectora desagradable, que lleva a expulsar la comida de la boca. A diferencia de las células olfativas que contienen una sola proteína receptora, una sola célula de las papilas gustativas que evoca una sensación amarga contiene una variedad de diferentes receptores T2R que responden a sustancias nocivas no relacionadas. Como resultado, muchas sustancias evocan el mismo gusto básico, lo cual responde a que la comida que hemos comido es amarga y desagradable. En contraste, una comida que provoca un gusto dulce es probable que contenga carbohidratos ricos en energía. Los humanos poseen solamente un receptor del sabor dulce de alta afinidad (un heterodímero T1R2-T1R3) que responde a los azúcares, ciertos péptidos de sabor dulce y proteínas (p. ej., monelina), y edulcorantes artificiales. Los receptores de umami consisten en un heterodímero TR1-TR3. Por suerte, la comida que se mastica libera odorantes que van desde la garganta a las neuronas olfativas en la mucosa nasal, lo que permite al cerebro aprender más acerca del alimento que hemos comido que sólo a través de los mensajes relativamente sencillos que ofrecen los receptores del gusto. Es esta combinación de los receptores olfativos y del gusto (gustativo) la que proporciona el rico sentido del gusto. La importancia de las neuronas olfativas en la percepción del gusto se hace más evidente cuando tenemos un resfriado, lo que provoca que se pierda algo de nuestra apreciación del gusto de la comida.

**REPASO**

1. Describa la función de los GPCR en la visión, la detección de olores y el sentido del gusto.

## 15.10 Fosforilación de proteína-tirosina como un mecanismo para la transducción de señal

Las **proteína-tirosina cinasas** son enzimas que fosforilan residuos específicos de tirosina en sustratos proteicos. La fosforilación proteína-tirosina es un mecanismo para la transducción de señal

[1] El genoma humano contiene aproximadamente 1 000 genes que codifican receptores odorantes pero la mayoría está presentes como pseudogenes no funcionales (p. 391). Los ratones, que dependen más que los humanos de su sentido del olfato, tienen más de 1 000 de estos genes en su genoma, y 95% de ellos codifican receptores funcionales.

que apareció con la evolución de los organismos multicelulares. Alrededor de 90 diferentes proteína-tirosina cinasas son codificadas por el genoma humano. Estas cinasas están involucradas en la regulación del crecimiento, la división, la diferenciación, la supervivencia, la fijación a la matriz extracelular y la migración celular. La expresión de proteína-tirosina cinasas mutantes que no se regulan y están activas de manera continua pueden conducir a una división celular descontrolada y el desarrollo de cáncer. Un tipo de leucemia, por ejemplo, se produce en células que contienen una versión no regulada de la proteína-tirosina cinasa ABL.

Las proteína-tirosina cinasas se pueden dividir en dos grupos: **receptor proteína-tirosina cinasas** (RTK, *receptor protein-tyrosine kinases*), son proteínas integrales de membrana que contienen una sola hélice transmembrana y un dominio de unión a ligando extracelular, y un **no receptor** (o *citoplasmático*) **proteína-tirosina cinasas**. El genoma humano codifica casi 60 RTK y 32 no receptores TK. Los primeros RTK que se estudiaron, EGFR, se identificaron en 1978 por Stanley Cohen de la Universidad Vanderbilt. El descubrimiento del primer no receptor TK se debate en la sección 16.3. Los RTK se activan directamente por los factores de crecimiento y diferenciación extracelular como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF, *platelet-derived growth factor*) o por reguladores metabólicos como la insulina. Los no receptores proteína-tirosina cinasas se regulan indirectamente por señales extracelulares, y controlan procesos diversos como la respuesta inmunitaria, la adhesión celular y la migración neuronal. Esta sección del capítulo se centra en la transducción de señal por los RTK.

## Dimerización del receptor

Una pregunta obvia viene a la mente cuando se considera la mecánica de la transducción de señal: ¿cómo es que la presencia de un factor de crecimiento fuera de la célula traduce cambios bioquímicos dentro de la célula? Numerosos estudios estructurales y bioquímicos han demostrado que la unión del ligando resulta en la dimerización de los dominios extracelulares de unión del ligando de un par de receptores. Se han reconocido dos mecanismos para la dimerización del receptor: la dimerización mediada por ligando y la dimerización mediada por receptor (**FIGURA 15-17**). Los primeros trabajos sugirieron que los ligandos de RTK contienen dos sitios de unión al receptor. Esto hizo posible que una sola molécula de factor de diferenciación o crecimiento se uniera a dos receptores al mismo tiempo, causando la dimerización del receptor mediado por ligando (figura 15-17*a*). Este modelo fue respaldado por la observación de que los factores de crecimiento y diferenciación como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor estimulante de colonias-1 (CSF-1, *colony-stimulating factor-1*) están compuestos de dos subunidades de enlace disulfuro similares o idénticas, en el cual cada subunidad contiene un sitio de enlace al receptor. Sin embargo, no todos los factores de crecimiento que se encontraron se ajustaron a este modelo. Algunos factores de crecimiento (p. ej., EGF o TGF) contienen sólo un único sitio de enlace al receptor. El trabajo estructural ahora admite un segundo mecanismo (figura 15-17*b*), en el que la unión del ligando induce un cambio conformacional del dominio extracelular de un receptor, lo que conduce a la formación o exposición de una interfaz de dimerización del receptor. Con este mecanismo, los ligandos funcionan como reguladores alostéricos que cambian la capacidad de sus receptores para formar dímeros. Un pequeño número de los RTK, incluidos los receptores de insulina y de IGF-1, están presentes como dímeros inactivos en ausencia de ligando (véase figura 15-24). Para la mayoría de los RTK la dimerización resulta en la yuxtaposición de dos dominios proteína-tirosina cinasas en el lado citoplásmico de la membrana plasmática. La puesta de dos dominios cinasas en contacto estrecho permite la *transautofosforilación,* en la que la actividad de la proteína cinasa de un receptor del dímero fosforila los residuos de tirosina en el dominio citoplásmico de otro receptor del dímero y viceversa (figura 15-17*a,b*).

## Activación de la proteína cinasa

Los sitios de autofosforilación en los RTK pueden desempeñar dos funciones diferentes: pueden regular la actividad cinasa del receptor o servir como sitios de unión para moléculas de señalización citoplásmica. Por lo general, la actividad cinasa se controla por la autofosforilación de los residuos de tirosina, los cuales están presentes en el *asa de activación* del dominio cinasa. El asa de activación, cuando no está fosforilada, obstruye el sitio de unión del sustrato, de este modo previene la entrada de ATP. Luego de su fosforilación, el asa de activación se estabiliza en una posición lejos del sitio de unión del sustrato, resultando en la activación del dominio cinasa. Una vez que su dominio cinasa ha sido activado, las subunidades del receptor proceden a fosforilar cada uno de los residuos de tirosina que están presentes en regiones adyacentes al dominio cinasa. Son estos sitios de autofosforilación los que funcionan como sitios de unión para las proteínas de señalización celular.

## Interacciones proteína-proteína dependiente de fosfotirosina

Las vías de señalización consisten en una cadena de proteínas de señalización que interactúan unas con otras de una forma secuencial (véase figura 15-3). Las proteínas de señalización son capaces de asociarse con los receptores proteína-tirosina cinasa activados, debido a que algunas proteínas contienen dominios que enlazan específicamente residuos de tirosina fosforilados (como en la figura 15-17). Los dominios de unión pTir mejor estudiados son el *dominio Src-homología 2* (SH2, *Src-homology 2*) y el *dominio de unión a fosfotirosina* (PTB, *phosphotyrosinebinding*). Los dominios SH2 fueron identificados inicialmente como parte de proteínas codificadas por el genoma de los virus que causan tumores (oncogénico). Ellos están compuestos de aproximadamente 100 aminoácidos y contienen un bolsillo de unión conservado que acomoda un residuo de tirosina fosforilado (**FIGURA 15-18**). Más de 110 dominios SH2 están codificados por el genoma humano. Median una gran cantidad de interacciones proteína-proteína dependiente de la fosforilación. Estas interacciones ocurren después de la fosforilación de residuos específicos de tirosina. La especificidad de las interacciones está determinada por la secuencia de aminoácidos adyacentes inmediatamente a los residuos de tirosina fosforilados. Por ejemplo, el dominio SH2 de la proteína-tirosina cinasa Src reconoce pTir-Glu-Glu-Ile, mientras que los dominios SH2 de PI 3-cinasa se unen a pTir-Met-X-Met (en el que X puede ser cualquier residuo). Es interesante destacar que el genoma de la levadura de panadería codifica sólo una proteína que contiene un dominio SH2, que se correlaciona con la pérdida general de la actividad de señalización de la tirosina cinasa en aquellos eucariotas unicelulares inferiores.

Los dominios PTB se descubrieron recientemente. Pueden unirse a residuos de tirosina fosforilada que generalmente están presentes como parte de un motivo asparagina-prolina-X-tirosina (Asn-Pro-X-Tir). Sin embargo, la historia es más complicada, debido a que algunos dominios PTB parecen unirse específicamente a un motivo Asn-Pro-X-Tir no fosforilado, mientras que otros se unen específicamente al motivo fosforilado. Los dominios PTB están mal conservados y diferentes dominios PTB poseen distintos residuos que interactúan con sus ligandos.

## Activación de las vías de señalización corriente abajo

Se ha observado que los receptores proteína-tirosina cinasas (RTK) están autofosforilados en uno o más residuos de tirosina.

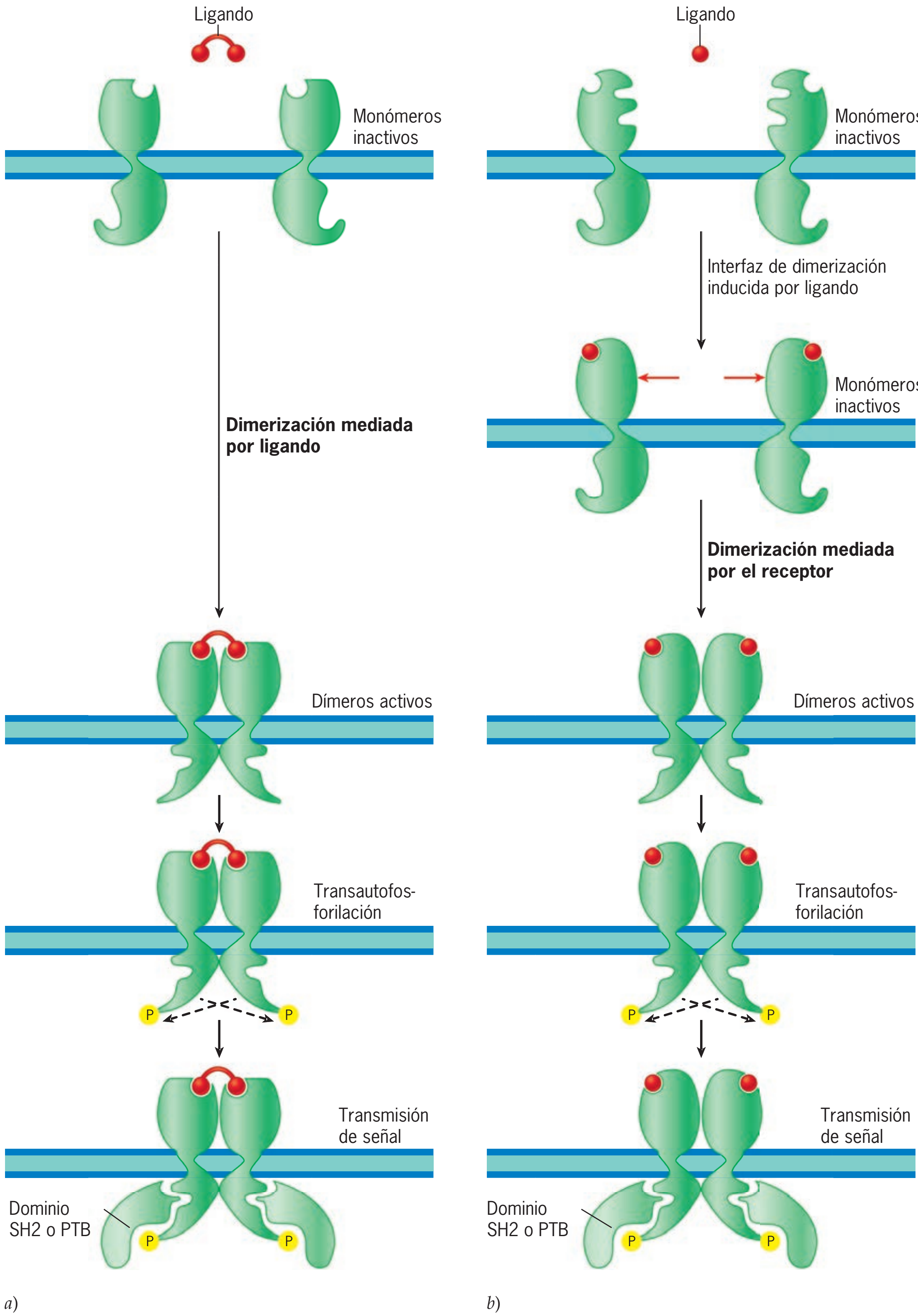



**FIGURA 15-17 Pasos en la activación de un receptor proteína-tirosina cinasa (RTK).** *a*) Dimerización mediada por ligando. En el estado no activado, los receptores están presentes en la membrana como monómeros. La unión de un ligando bivalente conduce directamente a la dimerización del receptor y la activación de su actividad cinasa, lo cual provoca la adición de grupos fosfato al dominio citoplasmático de la otra subunidad del receptor. Los residuos de fosfotirosina recién formados del receptor sirven como sitios de unión para proteínas blanco que contienen dominios SH2 o PTB. Las proteínas blanco se activan como resultado de su interacción con el receptor. *b*) Dimerización mediada por receptor. La secuencia de eventos es similar a los de la parte *a*, excepto que el ligando es monovalente y, en consecuencia, una molécula de ligando separada se une a cada uno de los monómeros inactivos. La unión de cada ligando induce un cambio conformacional en el receptor que crea una interfaz de dimerización (flechas rojas). Los monómeros unidos a ligando interactúan a través de esta interfaz para convertirse en un dímero activo.

FUENTE: *a*-*b*) Basado en un dibujo de J Schlessinger y A Ullrich. *Neuron* 1992;9:384; con permiso de Cell Press Neuron por Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto vía Copyright Clearance Center.

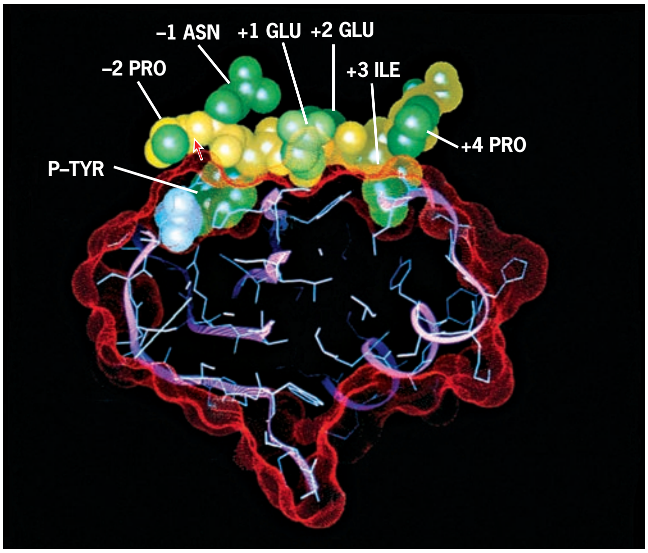



**FIGURA 15-18** La interacción entre un dominio SH2 de una proteína y un péptido que contiene un residuo de fosfotirosina. El dominio SH2 de la proteína se muestra en una vista seccionada con el área de superficie accesible representada por puntos rojos y el esqueleto del polipéptido como una cinta púrpura. El heptapéptido que contiene fosfotirosina (Pro-Asn-pTir-Glu-Glu-Ile-Pro) se muestra como un modelo de relleno de espacio cuyas cadenas laterales son de color verde y el esqueleto es de color amarillo. El grupo fosfato se muestra en azul claro. El residuo fosforilado de tirosina y el residuo de isoleucina (+3) se proyectan hacia los bolsillos en la superficie del dominio SH2, creando una interacción estrechamente adecuada, pero sólo cuando el residuo clave de tirosina se fosforila.

FUENTE: De Gabriel Waksman, *et al*. Cortesía de John Kuriyan. *Cell* 1993;72:783. Reproducido con permiso de Elsevier.

Una variedad de proteínas de señalización con dominios SH2 o PTB están presentes en el citoplasma. Por tanto, la activación del receptor resulta en la formación de complejos de señalización, en los cuales las proteínas que contienen SH2 o PTB se unen a sitios específicos de autofosforilación presentes en el receptor (como en la figura 15-17). Se pueden distinguir varios grupos de proteína de señalización, los cuales pueden interactuar con RTK activados, incluyendo proteínas adaptadoras y de andamiaje, factores de transcripción y enzimas (**FIGURA 15-19**).

- Las proteínas adaptadoras y de andamiaje funcionan como enlazadores que permiten que dos o más proteínas de señalización se unan como parte de un complejo de señalización (figura 15-19*a*). Las proteínas adaptadoras contienen un dominio SH2 y uno o más dominios de interacción proteína-proteína adicionales. Por ejemplo, la proteína adaptadora Grb2 contiene un dominio SH2 y dos SH3 (Src homología 3) (figura 15-20). Como se muestra en la figura 2-42, los dominios SH3 se unen a motivos de secuencia ricos en prolina. Los dominios SH3 de Grb2 se unen constitutivamente a otras proteínas, incluyendo Sos y Gab. El dominio SH2 se une a restos de tirosina fosforilados dentro de un motivo Tir-X-Asn. En consecuencia, la fosforilación de la tirosina del motivo Tir-X-Asn en un RTK da como resultado la translocación de Grb2-Sos o Grb2-Gab del citosol a un receptor, que está presente en la membrana plasmática (figura 15-19*a*).

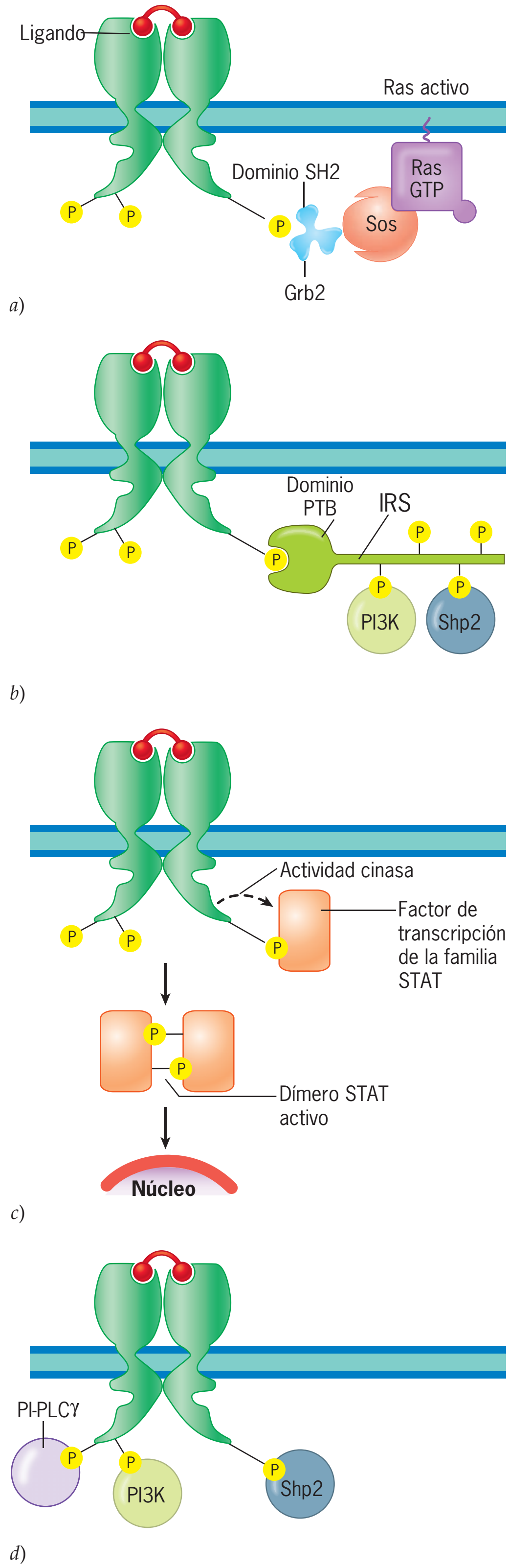



**FIGURA 15-19 Una diversidad de proteínas de señalización.** Las células contienen numerosas proteínas con dominios SH2 o PTB que se unen a residuos de tirosina fosforilados. *a*) Las proteínas adaptadoras, como Grb2, funcionan como un enlace entre otras proteínas. Como se muestra aquí, Grb2 puede servir como un enlace entre el factor de crecimiento RTK activado y Sos, un activador de una proteína corriente abajo llamada Ras. La función de Ras se analiza más adelante. *b*) La proteína de acoplamiento IRS contiene un dominio PTB que le permite unirse al receptor activado. Una vez unidos, los residuos de tirosina en la proteína de acoplamiento son fosforilados por el receptor. Estos residuos fosforilados funcionan como sitios de unión para otras proteínas de señalización. *c*) Ciertos factores de transcripción se unen a RTK activados, un evento que conduce a la fosforilación y activación del factor de transcripción y su translocación al núcleo. Los miembros de la familia STAT de factores de transcripción se activan de esta manera. *d*) Se activa una amplia gama de enzimas de señalización después de unirse a RTK desactivado. En el caso que se representa aquí, una fosfolipasa (PLC-γ), una cinasa lipídica (PI3K) y una proteína-tirosina fosfatasa (Shp2) se han unido a sitios de fosfotirosina en el receptor.

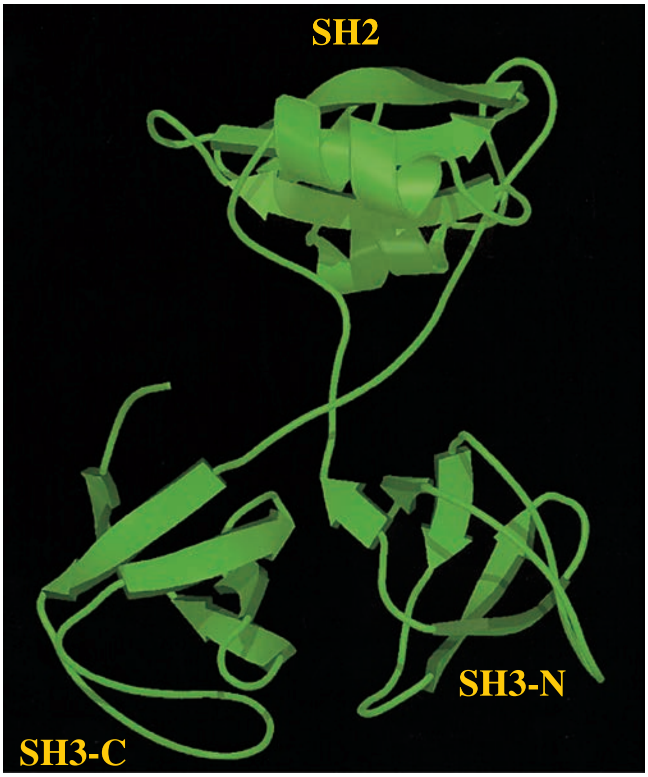



**FIGURA 15-20 Estructura terciaria de una proteína adaptadora, Grb2, que consta de tres partes: dos dominios SH3 y un dominio SH2.** Los dominios SH2 se unen a una proteína (p. ej., el receptor EGF activado) que contiene un motivo particular que incluye un residuo de fosfotirosina. Los dominios SH3 se unen a una proteína (p. ej., Sos) que contiene un motivo particular que es rico en residuos de prolina. Se han identificado docenas de proteínas que tienen estos dominios. Las interacciones que implican los dominios SH3 y SH2 se muestran en las figuras 2-42 y 15-18, respectivamente. Otras proteínas adaptadoras incluyen Nck, Shc y Crk.

FUENTE: Tomada de Sébastien Maignan, *et al. Science* 1995;268:291. Reimpreso con autorización de AAAS. Imagen proporcionada por cortesía de Arnaud Ducruix.

- Los factores de transcripción se discutieron extensamente en el capítulo 12. De ellos los que pertenecen a la familia STAT cumplen una función importante en el sistema inmunitario. Las STAT contienen un dominio SH2 junto con un sitio de fosforilación de tirosina que funciona como sitio de enlace para el dominio SH2 de otra molécula STAT (figura 15-19*c*). La fosforilación de la tirosina en los sitios de unión de STAT SH2 que se encuentran dentro de un receptor dimerizado conduce al reclutamiento de proteínas STAT (figura 15-19*c*). Por la asociación con el complejo receptor los residuos de tirosina en estas proteínas están fosforilados. Como resultado de la interacción entre los residuos de tirosina fosforilados en una proteína STAT y el dominio SH2 en otra proteína STAT, y viceversa, la transcripción de factores formará dímeros. Estos, pero no los monómeros, se mueven al núcleo donde estimulan la transcripción de genes específicos involucrados en la respuesta inmunológica. La función de las STAT en la señalización de una respuesta inmunitaria se discute en la sección 17.13.
- Las enzimas de señalización incluyen proteínas cinasas, proteínas fosfatasas, cinasas lipídicas, fosfolipasas y proteínas activadoras de GTPasa. Cuando están equipadas con dominios SH2, estas enzimas se asocian con RTK activadas y cambian directa o indirectamente como consecuencia de esta asociación (figura 15-19*d*). Se han identificado tres mecanismos generales mediante los cuales estas enzimas se activan después de su asociación con un receptor. Las enzimas pueden activarse simplemente como resultado de la translocación a la membrana, lo que los coloca muy cerca de sus sustratos. Las enzimas también se pueden activar a través de un mecanismo alostérico (p. 110), en el que la unión a fosfotirosina da como resultado un cambio conformacional en el dominio SH2 que provoca un cambio conformacional en el dominio catalítico, lo que resulta en una variación en la actividad catalítica. Por último, las enzimas pueden ser reguladas directamente por fosforilación. Como se describirá a continuación, las proteínas de señalización se asocian con los RTK activados e inician cascadas de eventos que conducen a los cambios bioquímicos que se requieren para responder a la presencia de moléculas mensajeras extracelulares.

### Terminación de la respuesta

De modo general la transducción de señales por RTK termina con la internalización del receptor, principalmente a través de endocitosis mediada por clatrina (sección 8.17). Algunos RTK poseen un motivo de secuencia corta en su dominio citoplasmático que se une a la proteína adaptadora clatrina AP-2, la cual se piensa media en su internalización. Numerosos informes recientes también apuntan a la ubiquitinación de los RTK como una función clave en la internalización. Las ligasas ubiquitina (más notablemente, las de la familia Cbl) se asocian con el complejo de señalización RTK a través de dominios SH2 o proteínas adaptadoras, y luego se unen covalentemente una o más ubiquitinas al RTK, marcándolo para su internalización. Como en el caso de los GPCR (figura 15-7), los RTK internalizados pueden tener varios destinos alternativos; pueden degradarse en los lisosomas, devolverse a la membrana plasmática, o volverse parte de los complejos de señalización endosómicos y ocuparse de la señalización intracelular continuada.

Ahora que se han discutido algunos de los mecanismos generales por los cuales los RTK son capaces de activar vías de señalización, se puede observar más de cerca en varias vías importantes que se activan corriente abajo de los RTK. Primero se discutirá la vía Ras-MAP cinasa, la cual es, probablemente, la cascada de señalización mejor caracterizada que se convierte en activa por las proteína- tirosina cinasas. Una cascada diferente será descrita en el contexto del receptor de insulina.

**REPASO**

1. ¿Qué es un dominio SH2 y qué función desempeña en las vías de señalización?

## 15.11 La vía de la cinasa Ras-MAP

Los retrovirus son pequeños virus que llevan su información genética en la forma de RNA. Algunos de ellos contienen genes, llamados oncogenes, que tienen la habilidad de transformar células normales en células tumorales. Ras se describió originalmente como el producto de un oncogén retroviral y luego se determinó que se deriva del mamífero huésped. Después se descubrió que aproximadamente 30% de todos los cánceres humanos contienen versiones mutantes de genes *RAS*. En este punto es importante destacar que las proteínas Ras son parte de una superfamilia de más de 150 pequeñas proteínas G (monomérica) incluso las Rabs (p. 288), Sar1 (p. 283), y Ran (p. 464). Estas proteínas están involucradas en la regulación de numerosos procesos, incluso la división y diferenciación celular, la expresión de genes, la organización del citoesqueleto, el transporte vesicular y el transporte nucleocitoplásmico. Los principios discutidos en relación con Ras se aplican a muchos miembros de la superfamilia de la pequeña proteína G.

Ras es una pequeña GTPasa que está anclada en la superficie interna de la membrana plasmática por un grupo de lípidos unidos covalentemente que están incrustados en la lámina interna de la bicapa (figura 15-19*a*). Ras es funcionalmente similar a las proteínas G heterotriméricas que se discutieron anteriormente y, similar a aquellas proteínas, Ras funciona como interruptor y temporizador molecular. Sin embargo, a diferencia de las proteínas G heterotriméricas, Ras consiste sólo de una pequeña subunidad. Las proteínas Ras están presentes en dos formas diferentes: una forma GTP dominio activa y una forma GDP dominio inactiva (**FIGURA 15-21*a***). Ras-GTP se une y activa la señalización corriente abajo de las proteínas. Ras se desactiva por hidrólisis de su dominio GTP a GDP. Las mutaciones en uno de los genes *RAS* humanos que conducen a la formación de tumores evitan la hidrólisis de la proteína que convierte el dominio GTP de nuevo en GDP. Como resultado, la versión mutante de Ras permanece en posición "encendido", enviando un mensaje continuo corriente abajo a lo largo de la vía de señalización y mantiene a la célula en un modo proliferativo.

## Proteínas accesorias

El ciclo de las proteínas monoméricas G, como Ras, entre los estados activos e inactivos es auxiliado por proteínas accesorias que se unen a la proteína G y regulan su actividad (figura 15-21*b*). Estas proteínas accesorias incluyen:

1. ***Proteínas activadoras de GTPasa*** (**GAP**, *GTPase-activating proteins*). La mayoría de las proteínas G monoméricas poseen alguna capacidad de hidrolizar un enlace GTP, pero esta capacidad se acelera mucho por la interacción con GAP específicas. Debido a que estimulan la hidrólisis del GTP unido, que inactiva la proteína G, las GAP dramáticamente acortan la duración de una respuesta mediada por proteína G. Las mutaciones en uno de los genes Ras-GAP (*NF1*) provoca la neurofibromatosis 1, una enfermedad en la cual los pacientes desarrollan una gran cantidad de tumores benignos (neurofibromas) a lo largo de las vainas que revisten los nervios principales.
2. ***Factores de intercambio de nucleótidos de guanina*** (GEF, *guanine nucleotide-exchange factors*). Una proteína G inactiva se convierte a la forma activa cuando el dominio GDP se reemplaza con un GTP. Los GEF son proteínas que se unen a una proteína G inactiva monomérica y estimulan la disociación del GDP unido. Una vez que se libera el GDP, la proteína G se une rápidamente a un GTP, que está presente a una concentración relativamente alta en la célula, activando de este modo la proteína G.
3. ***Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina*** (**GDI,** *guanine nucleotide-dissociation inhibitors*). Los GDI son proteínas que inhiben la liberación de un dominio GDP de una proteína G monomérica, manteniendo así la proteína en el estado activo. La actividad y la localización de las diversas proteínas de acceso están reguladas estrechamente por otras proteínas, que regulan el estado de la proteína G.

Se puede pensar que Ras-GTP es un centro de señalización porque puede interactuar directamente con varios blancos corriente abajo. Aquí se discutirá Ras como un elemento de la **cascada Ras-MAP cinasa**, la cual se activa en respuesta a una amplia variedad de señales extracelulares y desempeña una función clave en la regulación de actividades vitales, tales como la proliferación y la diferenciación celulares. La vía transmite señales extracelulares desde la membrana plasmática al citoplasma y hacia

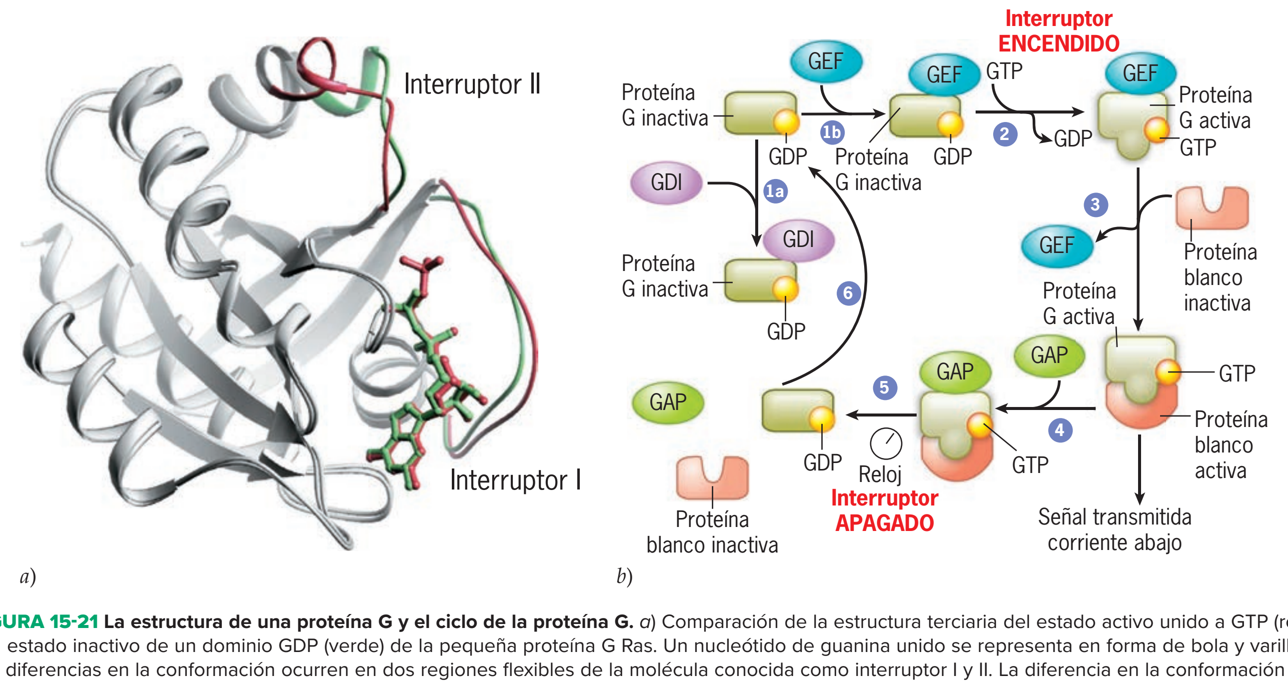



**FIGURA 15-21 La estructura de una proteína G y el ciclo de la proteína G.** *a*) Comparación de la estructura terciaria del estado activo unido a GTP (rojo) y el estado inactivo de un dominio GDP (verde) de la pequeña proteína G Ras. Un nucleótido de guanina unido se representa en forma de bola y varilla. Las diferencias en la conformación ocurren en dos regiones flexibles de la molécula conocida como interruptor I y II. La diferencia en la conformación que se muestra aquí afecta la capacidad de la molécula de unirse a otras proteínas. *b*) El ciclo de la proteína G. Las proteínas G están en su estado inactivo cuando están unidas por una molécula de GDP. Si la proteína G inactiva interactúa con un inhibidor de la disociación del nucleótido de guanina (GDI), se inhibe la liberación del GDP y la proteína permanece en el estado inactivo (paso 1a). Si la proteína G inactiva interactúa con un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, paso 1b), la proteína G intercambia su GDP por un GTP (paso 2), que activa la proteína G para que pueda unirse a una proteína blanco corriente abajo (paso 3). La unión del dominio GTP a la proteína G activa la proteína blanco, que es típicamente una enzima como una proteína cinasa o una proteína fosfatasa. Esto tiene el efecto de transmitir la señal corriente abajo a lo largo de la vía de señalización. Las proteínas G tienen una actividad GTPasa intrínseca débil que se estimula mediante la interacción con una proteína activadora de GTPasa (GAP) (paso 4). El grado de estimulación de GTPasa por un GAP determina el periodo que la proteína G está activa. En consecuencia, el GAP sirve como un tipo de reloj que regula la duración de la respuesta (paso 5). Una vez que se ha hidrolizado el GTP, el complejo se disocia, y la proteína G inactiva está lista para comenzar un nuevo ciclo (paso 6).

FUENTE: *a*) De Steven J Gamblin y Stephen J Smerdon. *Estructura* 1999;7:R200. Reproducido con permiso de Elsevier.

adentro del núcleo. El perfil general de la vía se representa en la figura 15-22. Esta vía se activa cuando un factor de crecimiento, como EGF o PDGF, se une al dominio extracelular de su RTK. Muchos RTK activados poseen residuos de tirosina fosforilados que actúan como sitios de acoplamiento para la proteína adaptadora Grb2, la cual, a su vez, se une a Sos, que es un factor intercambiador de nucleótido de guanina (un GEF) para Ras. La creación de un sitio de unión Grb2 en un receptor activado promueve la translocación Grb2-Sos desde el citoplasma a la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, colocando a Sos muy cerca de Ras (como en la figura 15-19*a*).

Simplemente llevando Sos a la membrana plasmática es suficiente para que cause la activación de Ras. Esto se ilustró por un experimento con una versión mutante de Sos que está permanentemente atada a la superficie interna de la membrana plasmática. La expresión de este dominio Sos de membrana mutante resulta en la activación constitutiva de Ras y la transformación de la célula en un fenotipo maligno. La interacción con Sos abre el sitio de unión de nucleótidos Ras. Como resultado, se libera GTP y se reemplaza por GTP. El intercambio de GDP por GTP en el sitio de unión de nucleótido Ras resulta en un cambio conformacional y la creación de un enlace interfaz para un número de proteínas, incluso una importante proteína de señalización llamada Raf. Esta se recluta a la superficie interna de la membrana plasmática donde se activa por una combinación de reacciones de fosforilación y desfosforilación.

Raf es una proteína cinasa serina-treonina. Uno de sus sustratos es la proteína cinasa MEK (figura 15-22). Esta se activa como una consecuencia de la fosforilación de Raf, pasa a fosforilar y activar dos MAP cinasas llamadas ERK1 y ERK2. Más de 160 proteínas que pueden ser fosforiladas por estas cinasas han sido identificadas, incluidos factores de transcripción, proteínas cinasas, proteínas del citoesqueleto, reguladores apoptóticos, receptores y otras proteínas de señalización. Una vez activada, la MAP cinasa es capaz de moverse dentro del núcleo donde fosforila y activa una cantidad de factores de transcripción y otras proteínas nucleares. Finalmente, la vía conduce a la activación de los genes involucrados en la proliferación celular, incluida la ciclina D1, que cumple una función clave en la conducción de una célula desde G1 hasta la fase S (figura 14-8).

Como se analiza en el siguiente capítulo, los oncogenes se identifican por su capacidad para hacer que las células se vuelvan cancerosas. Los oncogenes se derivan de genes celulares normales que han mutado o están sobreexpresados. Muchas de las proteínas que desempeñan una función en la vía de señalización Ras se descubrieron porque estaban codificadas por oncogenes que causaban cáncer. Esto incluye los genes para Ras, Raf y un número de factores transcripcionales generados al final de la vía (p. ej., Fos y Jun). Los genes para varios de los RTK situados al comienzo de la vía, incluyen los receptores para EGF y PDGF, también se han identificado entre los muchos oncogenes conocidos. El hecho de que muchas proteínas en esta vía se codifican por genes que pueden provocar cáncer cuando mutan enfatiza la importancia de la vía en el control del crecimiento y la proliferación celular.

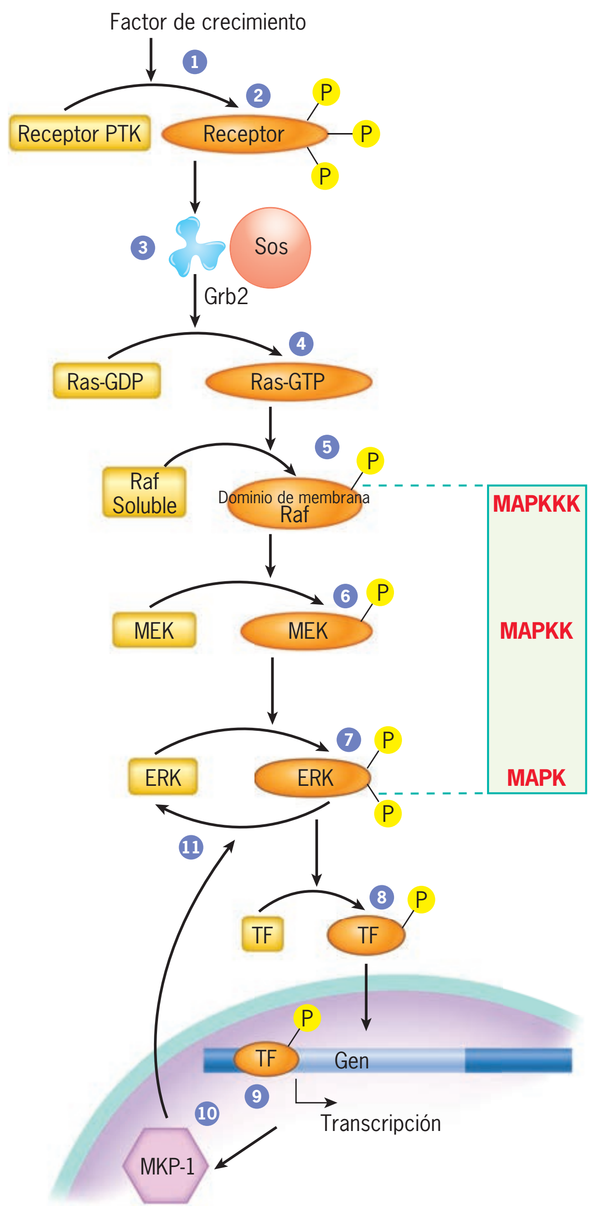



**FIGURA 15-22 Los pasos de una cascada común de MAP cinasa.** La unión del factor de crecimiento a su receptor (paso 1) conduce a la autofosforilación de los residuos de tirosina del receptor (paso 2) y el posterior reclutamiento de las proteínas Grb2-Sos (paso 3). Este complejo causa el intercambio GTP-GDP de Ras (paso 4), que recluta la proteína Raf a la membrana, donde se fosforila y así se activa (paso 5). En la vía representada aquí, Raf fosforila y activa otra cinasa llamada MEK (paso 6), que a su vez fosforila y activa aún otra cinasa denominada ERK (paso 7). Este esquema de fosforilación de tres pasos que se muestra en los pasos 5-7 es característico de todas las cascadas de MAP cinasas. Debido a su actividad cinasa secuencial, Raf se conoce como MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, *MAP kinase kinase kinase*), MEK como MAP cinasa cinasa (MAPKK, *MAP kinase kinase*) y ERK como MAP cinasa (MAPK, *MAP kinase*). Las MAPKK son cinasas de doble especificidad, un término que denota que pueden fosforilar residuos de tirosina así como de serina y treonina. Todas las MAPK tienen un tripéptido cerca de su sitio catalítico con la secuencia Thr-X-Tir. MAPKK fosforila MAPK tanto en los residuos de treonina como de tirosina de esta secuencia, activando así a la enzima (paso 7). Una vez activada, MAPK se traslada al núcleo donde fosforila los factores de transcripción (TF, *transcription factors*, paso 8), como Elk-1. La fosforilación de los factores de transcripción aumenta la vulnerabilidad de las entidades reguladoras en el DNA (paso 9), lo que conduce a un aumento en la transcripción de genes específicos (p. ej., *Fos* y *Jun*) implicados en la respuesta de crecimiento. Uno de los genes cuya expresión es estimulada codifica una MAPK fosfatasa (MKP-1; paso 10). Los miembros de la familia MKP pueden eliminar los grupos de fosfatos de los residuos de tirosina y treonina de MAPK (paso 11), que activa MAPK y detiene la actividad de señalización a lo largo de la ruta.

FUENTE: H Sun y NK Tonks. *Trends Biochem Science* 1994;19:484. Tendencias en Ciencias Bioquímicas por la Unión Internacional de Bioquímica reproducidas con la autorización de Elsevier Ltd en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través del Copyright Clearance Center.

## Adaptación de MAP cinasa para transmitir diferentes tipos de información

La misma vía básica de los RTK a través de Ras a la activación de factores de transcripción, como se ilustra en la figura 15-22, se encuentra en todos los eucariotas investigados, desde las levaduras hasta las moscas, los nemátodos y los mamíferos. La evolución ha adaptado la vía para cumplir muchos propósitos. En la levadura, por ejemplo, las células requieren la cascada de la MAP cinasa para responder a los factores de unión; en las moscas de la fruta la vía se utiliza durante la diferenciación de los fotorreceptores en el complejo ocular, y en las plantas de flores la vía transmite señales que inician una defensa contra patógenos. En cada caso el centro de la vía contiene un trío de enzimas que actúan secuencialmente, una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK) y una MAP cinasa (MAPK) (figura 15-22). Cada una de estos componentes está representado en un organismo en específico por una familia pequeña de proteínas. Hasta la fecha 14 diferentes MAPKKK, siete MAPKK y 13 MAPK han sido identificadas en los mamíferos. A través de la utilización de diferentes miembros de estas familias de proteínas los mamíferos son capaces de ensamblar una cantidad de distintas vías MAP cinasas que transmiten diferentes tipos de señales extracelulares. Se ha descrito cómo se transmite el impulso mitogénico a lo largo de un tipo de vía MAP cinasa que lleva a la proliferación celular. Por el contrario, cuando las células están expuestas a un estímulo estresante, como los rayos X o químicos dañinos, las señales que se transmiten a lo largo de las vías MAP cinasa causan que las células se retiren del ciclo celular antes que progrese como se muestra en la figura 15-22. La retirada de la célula del ciclo celular le da tiempo para reparar el daño que provocaron las condiciones adversas. Estudios recientes se enfocan en la especificidad de la señalización de las cascadas MAP cinasas en un intento de entender cómo las células son capaces de utilizar proteínas similares como componentes de las vías que arrojan diferentes respuestas celulares. Los estudios de las secuencias de aminoácidos y estructuras proteicas sugieren que parte de las respuestas radica en las interacciones selectivas entre las enzimas y los sustratos. Por ejemplo, ciertos miembros de la familia de las MAPKKK fosforila miembros específicos de la familia MAPK. Pero muchos miembros de estas familias pueden participar en más de una vía de señalización MAP.

La especificidad en las rutas de la MAP cinasa también se logra por la localización espacial de las proteínas componentes. La localización espacial se lleva a cabo por proteínas de andamiaje, cuya función aparente es unir los miembros apropiados de una vía de señalización en una orientación espacial específica que mejora sus interacciones mutuas. Los AKAP representados en la figura 15-16 son ejemplos de proteínas de andamiaje involucradas en las vías dirigidas por cAMP. Otro grupo de proteínas de andamiaje, como las proteínas de la levadura que se muestran en la **FIGURA 15-23 *a,b*)**, cumplen una función en las señales de enrutamiento a través de una de las varias rutas MAP cinasa. En algunos casos, las proteínas de andamiaje pueden tener una función activa en la señalización de eventos. Por ejemplo, pueden inducir un cambio en la conformación del dominio de proteínas señalizadoras, lo que causa su activación o inhibición. Unas pocas proteínas de andamiaje se conocen por tener una función enzimática, como se ilustra por la actividad MAPKK del andamio de la levadura Pbs2 que se muestra en la figura 15-23*b*). Además de facilitar una serie particular de reacciones, las proteínas de andamiaje evitan que proteínas involucradas en una vía de señalización participen en otras vías. Como un resultado, varias vías pueden compartir el mismo conjunto limitado de proteínas de señalización sin comprometer la especificidad. Este es el caso para la proteína MAPKKK Ste11 de la levadura que se muestra en la figura 15-23*a,b*), la cual participa en la unión y la respuesta osmorregulatoria y depende de cuál proteína de andamiaje ha interactuado. Recientes investigaciones han demostrado que las proteínas de andamiaje pueden asociarse con múltiples grupos distintos de proteínas a lo largo del tiempo, lo que permite que un receptor desencadene diferentes eventos corriente abajo en puntos de tiempo específico después de su activación. La importancia de las proteínas de andamiaje se ilustra bien en un experimento en el cual partes de dos diferentes proteínas de andamiaje de la cascada MAPK de la levadura (Ste5 y Pbs2) se combinaron genéticamente para formar una proteína quimérica (Ste5-Pbs2) (figura 15-23*c*). Normalmente estos dos andamios median dos diferente vías de señalización MAPK (figura 15-23*a,b*). Cuando las células de levadura contuvieron la proteína quimérica, se expusieron a un factor de unión que normalmente estimula la respuesta de unión y las células respondieron mostrando la respuesta osmorreguladora.

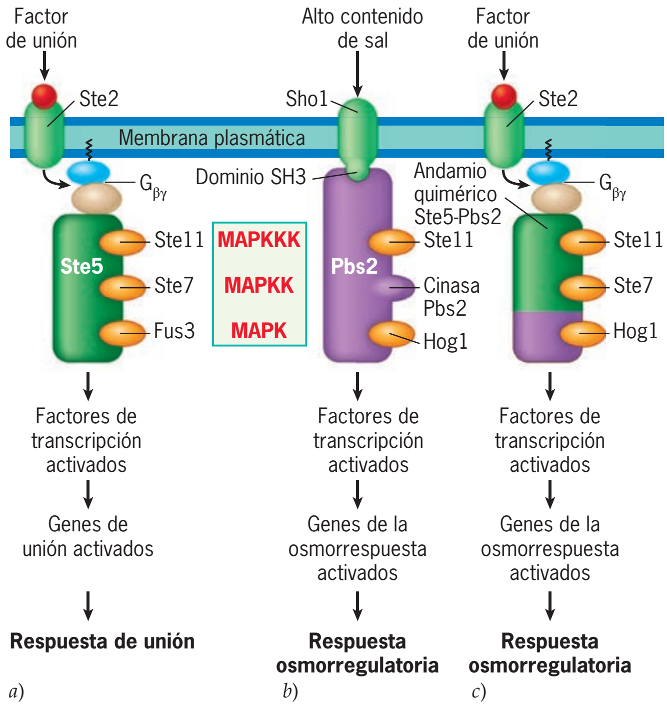



**FIGURA 15-23 Las funciones de las proteínas de andamiaje en la mediación de dos vías MAPK de la levadura.** *a*) La vía MAPK que regula la unión en estas células es provocada por un factor de acoplamiento que se une a un GPCR, Ste2, el cual conduce a la activación de una Gβγ que se une a la proteína de andamiaje Ste5, la cual a su vez se une a las proteínas MAPKKK, MAPKK y MAPK de la vía. *b*) La vía MAPK que regula la respuesta osmorregulatoria de la levadura en células expuestas a altas concentraciones de sal. El receptor activado (Sho1) se une a la proteína de andamiaje Pbs2 por su dominio SH3. El MAPKKK Ste11 se comparte en estas dos vías, pero se recluta en una u otra respuesta en virtud de su interacción con la proteína de andamiaje apropiada. El andamio Pbs2 no recluta MAPKK por separado, pero tiene su propia actividad enzimática MAPKK. *c*) Cuando las células se modifican genéticamente para expresar un andamio quimérico Ste5-Pbs2, responden a un factor de unión exhibiendo la respuesta osmorregulatoria. (Véase *Science* 2011;332:680, para una discusión de proteínas de andamiaje y este experimento.)

### REPASO

1. ¿Cuál es la función de Ras en las vías de señalización? ¿Cómo se afecta por la actividad de un Ras-GAP? ¿Cómo difiere Ras de una proteína G heterotrimérica?
2. ¿Cómo la cascada MAP cinasa altera la actividad transcripcional de una célula?

## 15.12 Señalización por el receptor de insulina

Nuestros cuerpos realizan un esfuerzo considerable en mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango estrecho. Un descenso en los niveles de glucosa en sangre puede conducir a la pérdida de conciencia y al coma, debido a que el sistema nervioso central depende en gran medida de la glucosa en sangre para su metabolismo energético. Una elevación persistente de los niveles de glucosa en sangre resulta en una pérdida de glucosa, fluidos y electrólitos en la orina y graves problemas de salud. Los niveles de glucosa en la circulación son monitoreados por el páncreas. Cuando los niveles de glucosa en sangre caen por debajo de un cierto nivel, las alfacélulas del páncreas secretan glucagón. Como se discutió anteriormente, el glucagón actúa a través de los GPCR y estimula la rotura del glucógeno, lo cual resulta en un incremento de los niveles de glucosa en sangre. Cuando ascienden los niveles de glucosa, como ocurre después de una comida rica en carbohidratos, las betacélulas del páncreas responden por la secreción de la insulina. Las funciones de la insulina como una molécula mensajera extracelular informan a las células que los niveles de glucosa son altos. Las células que expresan los receptores de insulina en su superficie, como las células en el hígado, responden a este mensaje por el incremento de la captación de la glucosa, el aumento del glucógeno, la síntesis de triglicéridos, y/o el descenso de la gluconeogénesis.

### El receptor de insulina es una proteína-tirosina cinasa

Cada receptor de insulina está compuesto de una cadena α y β, las cuales se derivan de una única proteína precursora por el procesamiento proteolítico. La cadena α es completamente extracelular y contiene el sitio de unión a insulina. La cadena β está compuesta de una región extracelular, una sola región transmembrana, y una región citoplásmica (**FIGURA 15-24**). Las cadenas α y β están unidas por enlaces disulfuro. Dos de estos heterodímeros αβ se retienen juntos por enlaces disulfuro entre las cadenas α. Por tanto, aunque la mayoría de los RTK se cree que están presentes en la superficie celular como los monómeros, los receptores de insulina se presentan como dímeros estables. Como otros RTK, los receptores de insulina son inactivos en ausencia del ligando (figura 15-24*a*). Un trabajo reciente sugiere que el dímero del receptor de insulina se une de forma estrecha a una sola molécula de insulina. Esto causa el reposicionamiento de los dominios unidos al ligando en el exterior de la célula, lo cual provoca los dominios de la tirosina cinasa en el interior de la célula para que suceda la proximidad física. La yuxtaposición de los dominios cinasa conduce a la transautofosforilación y la activación del receptor (figura 15-24*b*).

Se han identificado varios sitios de fosforilación de tirosina en la región citoplásmica del receptor de insulina. Tres de estos sitios de fosforilación están presentes en el asa de activación. En el estado desfosforilado, el asa de activación asume una conformación en la cual ocupa el sitio activo. En la fosforilación de tres residuos de tirosina, el asa de activación asume una nueva conformación lejos de la hendidura catalítica. Esta nueva conformación requiere una rotación de los pequeños y grandes lóbulos del dominio cinasa uno con respecto al otro, por tanto, juntos traen residuos que son esenciales para la catálisis más cercana. Además, las asas de activación al instante permiten la abertura de la hendidura catalítica para que los sustratos puedan unirse. Después de la activación del dominio cinasa, el receptor fosforila sus residuos de tirosina, los cuales se presentan de forma adyacente a la membrana y en la cola del carboxilo terminal (figura 15-24*b*).

### Sustratos del receptor de insulina 1 y 2

La mayoría de los RTK poseen sitios de autofosforilación, los cuales reclutan de forma directa proteínas de señalización que contienen el dominio SH2 (como en la figura 15-19*a*, *c* y *d*). El receptor de insulina es una excepción de esta regla debido a que se asocia con una pequeña familia de proteínas adaptadoras (figura 15-19*b*), llamadas **sustratos receptores de insulina** (IRS, *insulin-receptor substrates*). A su vez, los IRS proporcionan los sitios de unión para las proteínas de señalización que contienen dominio de SH2. Algunos de los eventos que ocurren durante la señalización de

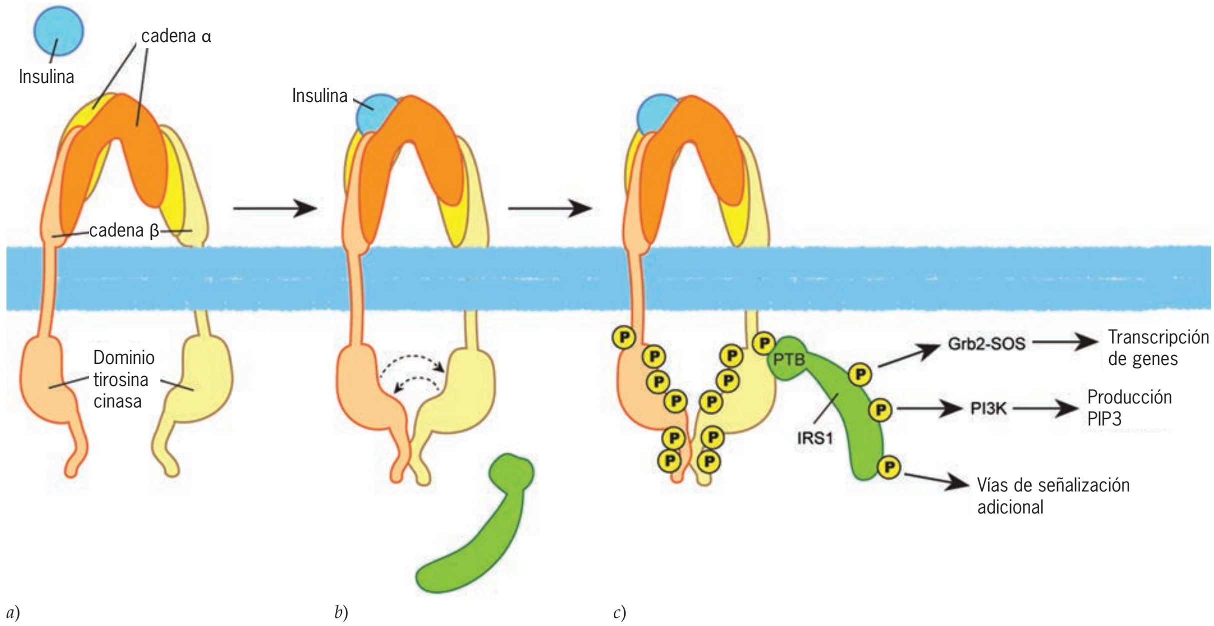



**FIGURA 15-24 La respuesta del receptor de insulina a la unión del ligando.** *a*) El receptor de insulina, que se muestra aquí en forma esquemática en el estado inactivo, es un tetrámero, el cual consta de dos subunidades α y dos subunidades β. *b*) La unión de una sola molécula de insulina a las subunidades α causa un cambio conformacional en las subunidades β, lo cual acciona la actividad de la tirosina cinasa de las subunidades β. Las subunidades β activadas fosforilan los residuos de tirosina localizados en el dominio citoplásmico del receptor, así como los residuos de tirosina en varios sustratos de receptores de insulina (IRS). *c*) Una vez unidos al receptor de insulina, se pueden fosforilar varios residuos de tirosina en el IRS y posteriormente servir como sitios de unión para otras proteínas, incluyendo una proteína adaptadora Grb2, una lípido cinasa PI3K u otras proteínas de señalización. La activación de Grb2 conduce a la activación de la vía de Ras y la transcripción de genes, mientras que la activación de PI3K conduce a la producción de PIP3.

insulina se muestran en la figura 15-24*c*. Seguida de la unión del ligando y la activación de la cinasa, el receptor de insulina autofosforila la tirosina 960, que luego forma un sitio de unión para los dominios de unión a la fosfotirosina (PTB, *phosphotyrosine binding*) de los sustratos del receptor de insulina. Como se indica en la figura 15-24*c*), los IRS se caracterizan por la presencia de un dominio PH N-terminal, un dominio PTB y una cola larga que contiene sitios de fosforilación de tirosina. El dominio PH puede interactuar con los fosfolípidos presentes en la lámina interna de la membrana citoplasmática, el dominio PTB se une a los sitios de fosforilación de la tirosina en el receptor activado, y los sitios de fosforilación de la tirosina proveen de sitios de unión a la señalización de proteínas que contienen dominio SH2. Al menos cuatro miembros de la familia IRS se han identificado. Sobre la base de los resultados obtenidos en los experimentos de bloqueo génico en ratones, se cree que los IRS-1 y los IRS-2 son los más relevantes para la señalización del receptor de insulina.

La autofosforilación del receptor de insulina activado de la Tir960 proporciona un sitio de unión para IRS-1 o IRS-2. Sólo después de una asociación estable tanto con el IRS-1 o el IRS-2, es el receptor de insulina activado capaz de fosforilar los residuos de tirosina presentes en estas proteínas adaptadoras (figura 15-24*c*). Tanto IRS-1 como IRS-2 contienen una gran cantidad de posibles sitios de fosforilación de tirosina que incluyen los sitios de unión para los dominios SH2 de la señalización de proteínas corriente abajo, incluyendo PI 3-cinasa, Grb2 y Shp2.

*La PI 3-cinasa (PI3K)* se compone de dos subunidades, una que contiene dos dominios SH2 y el otro que consta del dominio catalítico (**FIGURA 15-25**). La PI3K, la cual se activa de forma directa como consecuencia de la unión de sus dos dominios SH2 a los sitios de la fosforilación de la tirosina, fosforila fosfoinosítidos en la posición 3 del anillo del inositol. Los productos de esta enzima, que incluyen el PI3,4-bisfosfato (PI (3,4) P2) y PI 3,4,5-trifosfato ($PIP_3$), permanecen en la lámina citosólica de la membrana plasmática donde proporcionan los sitios de unión para la señalización de proteínas que contiene el dominio PH como la serina-treonina cinasa PKB y PDK1. Como se indica en la figura 15-25, la PKB (más comúnmente conocida como AKT) desempeña una función en la mediación de la respuesta a la insulina, así como otras señales extracelulares. El reclutamiento de PDK1 a la membrana plasmática, en estrecha proximidad a PKB, proporciona un ajuste en el cual PDK1 puede fosforilar y estimular la actividad de Ser/Thr cinasa de PKB (figura 15-25). Mientras la fosforilación por PDK1 es esencial, eso no es suficiente para la activación de PKB. La activación de PKB también depende de la fosforilación por una segunda cinasa, mTOR, la cual tiene una función crucial en la regulación de numerosas actividades celulares. La señalización de PI3K se termina por la eliminación del fosfato en la posición 3*n* en el anillo del inositol por la fosfatasa lipídica PTEN (figura 15-25).

## Transporte de glucosa

La PKB está directamente involucrada en la regulación del transporte de glucosa y la síntesis del glucógeno. El transportador de glucosa GLUT4 ejecuta el transporte de glucosa dependiente de insulina desde la sangre (p. 152). En ausencia de insulina, GLUT4 está atrapado en las vesículas membranales de las células sensibles a la insulina (**FIGURA 15-26**). Los hallazgos recientes sugieren que estas vesículas están unidas a la red cis-Golgi por una proteína llamada TUG, la cual se escinde en respuesta a la insulina, lo que causa que las vesículas GLUT4 se fundan con la membrana plasmática, un proceso que se conoce como translocación de GLUT4. El incremento en el número de transportadores de glucosa en la membrana plasmática conduce a un aumento de la captación de glucosa (figura 15-26).

El exceso de glucosa que se absorbe por las células musculares y hepáticas se almacena en forma de glucógeno. La síntesis de glucógeno se efectúa mediante la glucógeno sintasa, una enzima que se desactiva por la fosforilación de los residuos de serina y treonina. La glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3, *glycogen synthase kinase3*) ha sido identificada como un regulador negativo de la

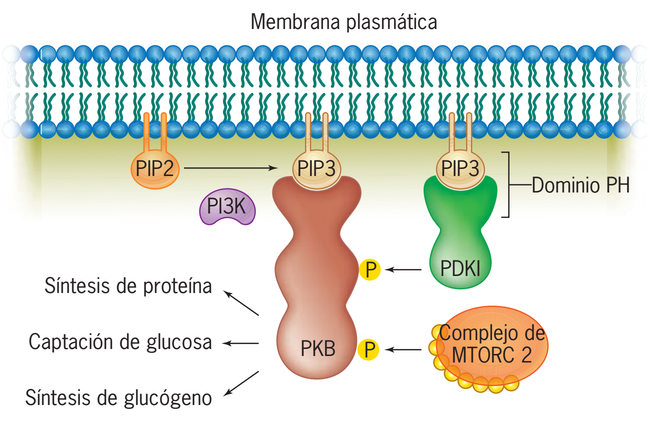



**FIGURA 15-25 La función de la PI 3-cinasa en la activación de una variedad de vías de señalización.** La activación de PI3K conduce a la formación de fosfoinosítidos unidos a la membrana, incluido el $PIP_3$. Una de las cinasas clave en numerosas vías de señalización es PKB (AKT), que interactúa con $PIP_3$ por medio de un dominio PH en la membrana plasmática. Esta interacción cambia la conformación de PKB, convirtiéndolo en un sustrato por otro $PIP_3$ unido a cinasa a (PDK1), que fosforila PKB. El segundo fosfato que se muestra vinculado a PKB se agrega por una segunda cinasa, en su mayoría probablemente mTOR. Una vez activado, PKB se disocia de la membrana plasmática y se mueve en el citosol y el núcleo. La PKB es un componente principal de una serie de vías de señalización separadas que median en la respuesta a la insulina. Estas vías conducen a la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana plasmática, a la síntesis de glucógeno y la síntesis de nuevas proteínas en la célula. La PKB también desempeña una función clave en la promoción de la supervivencia celular mediante la inhibición de la proteína proapoptótica Bad (p. 623) y/o la activación del factor de transcripción NF-kB (p. 625).

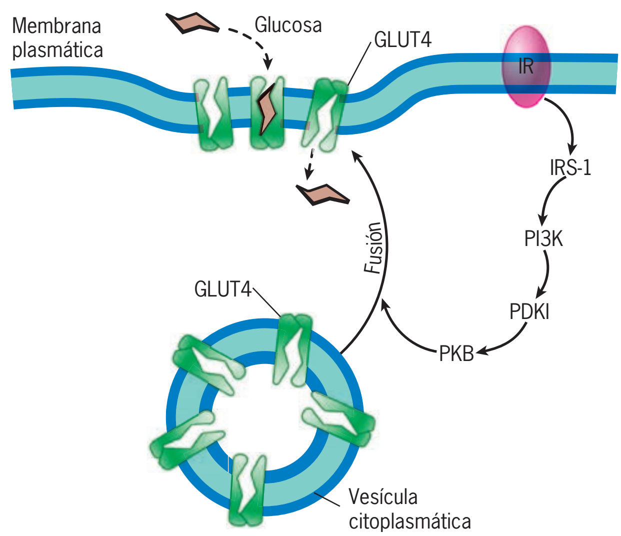



**FIGURA 15-26 Regulación de la captación de glucosa en células musculares y adiposas por la insulina.** Los transportadores de glucosa se almacenan en las paredes de las vesículas citoplasmáticas que brotan de la membrana plasmática (endocitosis). Cuando se elevan los niveles de insulina, se transmite una señal a través de la vía IRS-PI3K-PKB, que desencadena la translocación de las vesículas citoplásmicas a la periferia de la célula. Las vesículas se fusionan con la membrana plasmática (la exocitosis), entregan los transportadores a la superficie de la célula, donde pueden mediar la captación de la glucosa. Una segunda vía que conduce desde el receptor de insulina a la translocación de GLUT4 no se muestra (véase Trends Biochem Sci 2006;31:215).

FUENTE: D Voet y JG Voet. *Biochemistry* 1995;2e; copyright 1995, John Wiley & Sons, Inc. Reproducido con permiso de John Wiley & Sons, Inc.

glucógeno sintasa. A su vez, la GSK-3 se inactiva después de la fosforilación por PKB. Así, la activación de la vía PI 3-cinasa-PKB en respuesta a la insulina conduce a una disminución en la actividad de la GSK-3 cinasa, lo que provoca un aumento en la actividad de la glucógeno sintasa (figura 15-25*c*). La activación de la proteína fosfatasa 1, una enzima conocida por desfosforilar la glucógeno sintasa, contribuye en mayor medida a la activación de la glucógeno sintasa (figura 15-14).

### Diabetes mellitus

Una de las enfermedades humanas más comunes, la diabetes mellitus, es causada por defectos en la señalización de la insulina. La diabetes se presenta en dos variedades: la tipo 1, la cual representa de 5-10% de los casos, y la tipo 2, cuyos valores representan entre 90 y 95%. La diabetes tipo 1 se origina por la incapacidad para producir insulina y se discute en 17.3 "La perspectiva humana". La diabetes tipo 2 es una enfermedad mucho más compleja, cuya incidencia es creciente en todo el mundo con una tasa alarmante. La incidencia en ascenso de la enfermedad es más probable debido a los cambios en los estilos de vida y los hábitos alimenticios. Una dieta alta en calorías combinada con un estilo de vida sedentario se considera que conduce a un incremento crónico de la secreción de insulina. Los niveles elevados de insulina sobreestimulan las células blanco en el hígado y en otras partes del cuerpo, que conducen a una condición referida como *resistencia a la insulina*, en la cual estas células blanco detienen la respuesta en presencia de la hormona. Esta variación conduce a la elevación crónica de los niveles de glucosa en sangre, lo cual estimula que el páncreas secrete incluso más insulina, estableciendo un ciclo vicioso que en última instancia conduce a la muerte de las betacélulas secretoras de insulina del páncreas. La mayoría de los riesgos para la salud debido a la diabetes —enfermedad cardiovascular, ceguera, enfermedad renal y una reducción de la circulación a las extremidades que conlleva a las amputaciones— se deben al daño a los vasos sanguíneos del cuerpo, pero el mecanismo molecular por el cual la resistencia a la insulina y sus consiguientes efectos metabólicos conducen a esta condición están sujetos a debate.

**REPASO**

1. Describa los pasos entre la unión de una molécula de insulina en la superficie de una célula blanco y la activación del efector PI3K. ¿Cómo la acción de la insulina difiere de otros ligandos que actúan por medio del receptor tirosina cinasa?
2. ¿Cuál es la relación entre la diabetes tipo 2 y la producción de insulina? ¿Cómo un medicamento que aumenta la sensibilidad a la insulina podría ayudar a tratar esta enfermedad?

## 15.13 Vías de señalización en las plantas

Las plantas y los animales comparten ciertos mecanismos básicos de señalización, incluyendo el uso del $Ca^{2+}$ y los mensajeros fosfoinosítidos, pero otras vías son únicas para cada reino en particular. Por ejemplo, los nucleótidos cíclicos, los cuales pueden ser el mensajero celular animal más ubicuo, parece que desempeñan una pequeña función en la señalización celular en la planta, si es que existe. Los receptores tirosinas cinasas también están ausentes en las células de la planta. Por otro lado, las plantas contienen un tipo de proteína cinasa, la cual no está presente en las células de los animales.

Se sabe desde hace tiempo que las células bacterianas tienen una proteína cinasa, la cual fosforila los residuos de histidina y media la respuesta de la célula a una variedad de señales ambientales. Hasta 1993 se pensaba que estas enzimas estaban restringidas a las células bacterianas, pero luego se descubrieron tanto en la levadura como en las plantas de flores. En ambos tipos de eucariotas, las enzimas son proteínas transmembrana con un dominio extracelular, que actúa como un receptor para el estímulo externo y un dominio cinasa histidina citoplásmico que transmite la señal al citoplasma. Uno de los mejores estudios de estas proteínas de plantas es codificado por el gen *Etr1*. El producto del gen *Etr1* codifica un receptor para el gas etileno ($C_2H_4$), una hormona vegetal que regula una diversidad de procesos de desarrollo, incluyendo la germinación de las semillas, la floración y la maduración de la fruta. La unión del etileno a su receptor conduce a la transmisión de señales a lo largo de una vía que es muy similar a la cascada MAP cinasa encontrada en las células de la levadura y los animales. Como en otras eucariotas, los blancos corriente abajo de la vía de la MAP cinasa en las plantas son factores de transcripción que activan la expresión de genes específicos de codificación de proteínas requeridos para la respuesta a la hormona. Como los investigadores analizan la cantidad masiva de datos obtenidos de la secuenciación *Arabidopsis* y de otros genomas de planta, las similitudes y diferencias entre las vías de señalización de las plantas y los animales deberían aparecer más.

**REPASO**

1. ¿Qué tipos de proteínas de señalización son comunes en los animales, pero están ausentes de las células de los animales, y viceversa?

## 15.14 La función del calcio como un mensajero intracelular

Los iones de calcio desempeñan una función importante en una notable variedad de actividades celulares, incluso en la contracción del músculo, la respuesta inmunitaria, la división celular, la secreción, la fertilización, la transmisión sináptica, el metabolismo, la transcripción, el movimiento celular y la muerte celular. En cada uno de estos casos, se recibe un mensaje extracelular por la superficie de la célula y esto conduce a un dramático incremento de la concentración de iones de calcio dentro del citosol. La concentración de iones de calcio en un compartimiento celular particular es controlada por la actividad regulada de las bombas de $Ca^{2+}$, los intercambiadores $Ca^{2+}$, y/o los canales de iones de $Ca^{2+}$ ubicados dentro de las membranas que rodean el compartimiento (como en la figura 15-28). La concentración de iones de $Ca^{2+}$ en el citosol de una célula en reposo se mantiene en niveles muy bajos, generalmente alrededor de $10^{-7}$ M. Por el contrario, la concentración de este ion en el espacio extracelular o dentro de la luz del ER o una vacuola de una célula de una planta es típicamente 10 000 veces más alto que el citosol. El nivel de calcio citosólico se mantiene muy bajo porque 1) los canales de iones de $Ca^{2+}$ tanto en el plasma como en las membranas ER normalmente se mantienen cerrados, lo que causa que estas membranas sean altamente impermeables a este ion, y 2) sistemas de transporte de $Ca^{2+}$ impulsado del plasma y las membranas del ER bombean calcio fuera del citosol.[2] La elevación anormal de la concentración del $Ca^{2+}$ citosólico, como puede ocurrir en las células cerebrales después de una enfermedad cerebrovascular, puede conducir a una muerte celular masiva.

### $IP_3$ y los canales de $Ca^{2+}$ activados por voltaje

Se han descrito en las páginas anteriores dos tipos principales de receptores de señalización, los GPCR y RTK. Se observó en la

[2] La mitocondria también desempeña una función importante en el secuestro y liberación de los iones de $Ca^{2+}$, pero su actividad fue considerada en el capítulo 5 y no se discutirá aquí.

página 597 que la interacción de una molécula mensajera extracelular con un GPCR puede conducir a la activación de la enzima fosfolipasa C-β, la cual hidroliza el fosfoinosítido $PIP_2$, para liberar la molécula $IP_3$, que abre los canales del calcio en la membrana del ER, lo que conlleva a un aumento del $[Ca^{2+}]$ citosólico. Los mensajeros extracelulares que emiten señales a través de los RTK pueden generar una respuesta similar. La diferencia primaria es que los RTK activan los miembros de la subfamilia fosfolipasa C-γ, la cual posee un dominio SH2 que les permite la unión al RTK fosforilado y desactivado. Existen muchas otras isoformas de PLC. Por ejemplo, PLCδ se activa por los iones $Ca^{2+}$, y PLCε es activado por Ras-GTP. Todas las isoformas de PLC efectúan la misma reacción, produciendo $IP_3$ y enlazando una multitud de receptores de la superficie de la célula para incrementar el $Ca^{2+}$ citoplasmático. Existe otra ruta principal que conduce a la elevación del $[Ca^{2+}]$ citosólico, el cual se abordó en la discusión de la transmisión sináptica en la sección 4.18. En este caso, un impulso nervioso conduce a una despolarización de la membrana plasmática, lo que desencadena la abertura de los canales del calcio activados por voltaje en la membrana plasmática, que permite la afluencia de iones de $Ca^{2+}$ del medio extracelular.

## Visualización de la concentración de $Ca^{2+}$ citoplasmático en las células vivas

Nuestra comprensión de la función de los iones de $Ca^{2+}$ en las respuestas celulares ha avanzado mucho por el desarrollo de moléculas indicadoras que emiten luz en presencia de calcio libre. A mediados de la década de 1980, nuevos tipos de compuestos altamente sensibles, fluorescentes, que se unen al calcio (p. ej., *fura-2*) se desarrollaron en el laboratorio de Roger Tsien en la Universidad de California, San Diego. Estos compuestos se sintetizan en una forma que puede entrar a una célula por difusión a través de su membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, el compuesto se modifica a una forma que es incapaz de salir de la célula. Con el uso de estas sondas, la concentración de iones libres de calcio en diferentes partes de una célula viva puede determinarse por el monitoreo de la luz que emiten con el empleo de un microscopio fluorescente y técnicas de imágenes computarizadas. El uso de moléculas sensibles al calcio que emiten luz, ha provisto de retratos impresionantes de los complejos espaciales y cambios temporales en la concentración de calcio citosólico libre, que ocurre en una célula en respuesta a varios tipos de estímulos. Esta es una de las ventajas del estudio de respuestas mediadas por el calcio comparado a las respuestas mediadas por otros tipos de mensajeros, cuya ubicación en una célula no puede ser fácilmente visualizada.

Dependiendo del tipo de célula que responde, un estímulo particular puede inducir oscilaciones repetitivas en la concentración de iones de calcio libre, como se muestra en la figura 15-11; provocar la liberación de una onda de $Ca^{2+}$ que se extiende de un extremo a otro de la célula (véase figura 15-29); o desencadenar una liberación localizada y transitoria de $Ca^{2+}$ en una parte de la célula. En la **FIGURA 15-27** se detalla una célula de Purkinje, un tipo de neurona en el cerebelo del mamífero que mantiene contacto sináptico con miles de otras células mediante una red elaborada de dendritas postsinápticas. La micrografía en la figura 15-27 muestra la liberación de calcio libre en una región localizada del "árbol dendrítico" de la célula luego de la activación sináptica. La explosión de la liberación de calcio permanece restringida a esta región de la célula.

Los receptores $IP_3$ descritos anteriormente son uno de los dos tipos principales de canales de iones $Ca^{2+}$ presentes en la membrana del ER; el otro tipo se denomina *receptores de rianodina* (RyR, *ryanodine receptors*) porque se unen al alcaloide de la planta tóxica rianodina. Los receptores de rianodina se encuentran principalmente en las células excitables y se estudian mejor en las células musculares cardiacas y esqueléticas, donde median el aumento de los niveles de $Ca^{2+}$ después de la llegada de un potencial de acción. Las mutaciones en la isoforma RyR cardiaca se han relacionado con la ocurrencia de muerte súbita durante los periodos de ejercicio. Dependiendo del tipo de célula en la cual se encuentran, los RyR pueden abrirse por una variedad de agentes, incluido el calcio por sí mismo. La afluencia de una cantidad limitada de calcio a través de los canales abiertos en la membrana plasmática induce la abertura de los receptores de rianodina en el ER, causando la liberación del $Ca^{2+}$ en el citosol (**FIGURA 15-28**). Este fenómeno se llama *liberación de calcio inducida por calcio* (CICR, *calcium-induced calcium release*).

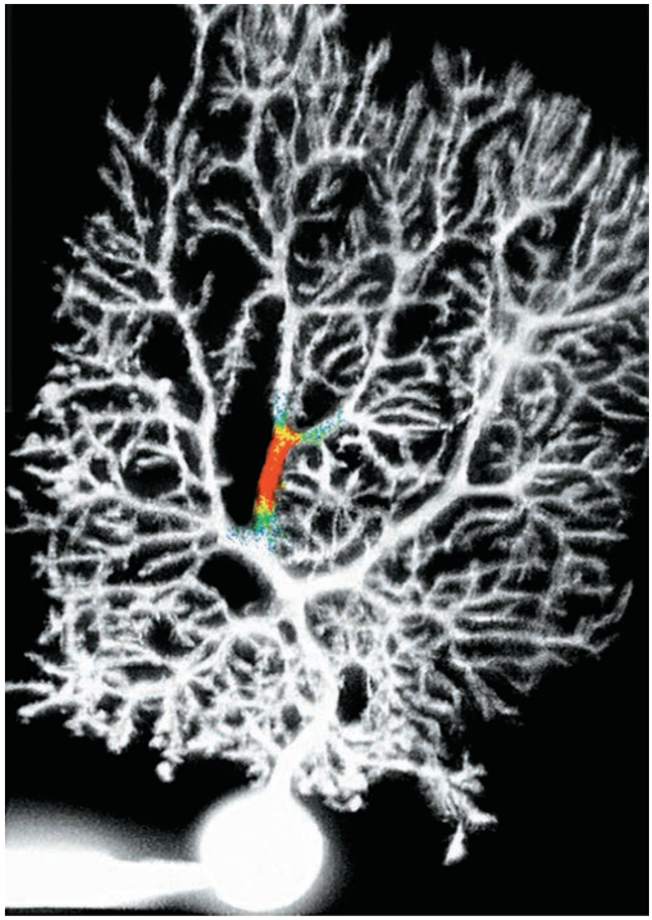


**FIGURA 15-27 Demostración experimental de liberación localizada de $Ca^{2+}$ intracelular dentro de una dendrita de una neurona.** El mecanismo de liberación del $Ca^{2+}$ mediado por $IP_3$ fue descrito en la figura 15-10. En la micrografía que se muestra aquí, la cual representa una imagen del enorme complejo de células de Purkinje (neurona) del cerebelo, los iones de calcio han sido liberados localmente en una pequeña porción del complejo "árbol dendrítico". La liberación de calcio del ER (que se muestra en rojo) se indujo en la dendrita luego de la producción local de $IP_3$, que siguió a la activación repetitiva de una sinapsis cercana. Los sitios de liberación de los iones $Ca^{2+}$ citosólico son revelados por la fluorescencia de un indicador de calcio fluorescente o que se cargó en la célula antes de su estimulación.

FUENTE: Tomada de Elizabeth A Finch y George J Augustine. *Nature* (396), portada del 24/12/98. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited.

Las señales extracelulares que se transmiten por los iones $Ca^{2+}$ generalmente actúan abriendo un número pequeño de canales de iones $Ca^{2+}$ en la superficie de la célula al sitio de los estímulos. Como los iones $Ca^{2+}$ se precipitan a través de estos canales y entran al citosol, ellos actúan próximos a los canales de iones $Ca^{2+}$ en el ER, lo cual causa que estos canales se abran y liberen calcio adicional dentro de las regiones adyacentes del citosol. En algunas respuestas, la elevación de los niveles de $Ca^{2+}$ restantes

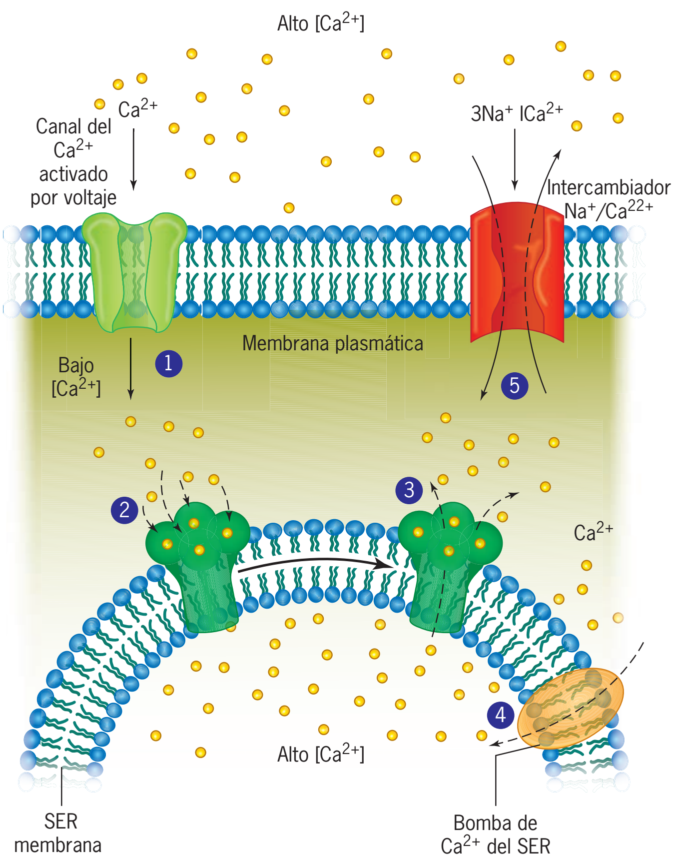



**FIGURA 15-28 Liberación de calcio inducida por calcio, como ocurre en una célula muscular cardiaca.** Una despolarización en el voltaje de la membrana provoca la abertura de canales del calcio activados por voltaje en la membrana plasmática, lo que permite la entrada de una pequeña cantidad de $Ca^{2+}$ en el citosol (paso 1). Los iones de calcio se unen a los receptores de rianodina en la membrana SER (paso 2), lo que conduce a la liberación del $Ca^{2+}$ almacenado en el citosol (paso 3), y desencadena la contracción de la célula. Los iones de calcio se eliminan posteriormente del citosol mediante la acción de las bombas de $Ca^{2+}$ situadas en la membrana del SER (paso 4) y un sistema de transporte secundario de $Na^{+}/Ca^{2+}$ en la membrana plasmática (paso 5), lo cual permite la relajación. Este ciclo se repite después de cada latido del corazón.

FUENTE: Michael Berride. *Nature* 1993;361:317. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

se localizan en una región pequeña del citosol (como en la figura 15-27). En otros casos, una onda propagada de calcio se disemina a través del compartimiento citoplasmático.

Uno de las más impresionantes ondas de $Ca^{2+}$ ocurre dentro del primer minuto seguido de la fertilización y se induce por el contacto del espermatozoide con la membrana plasmática del huevo (**FIGURA 15-29**). La repentina elevación de la concentración del calcio citoplasmático, luego de la fertilización, desencadena una serie de eventos, incluyendo la activación de las cinasas dependientes de ciclina (sección 14.4) que transporta el cigoto hacia su primera división mitótica.

La investigación reciente en el campo de la señalización del calcio se ha centrado en un fenómeno conocido como *entrada de $Ca^{2+}$ operada por depósitos intracelulares* (SOCE, *store-operated calcium entry*), en la que el "depósito" se refiere a los iones de calcio almacenados en el ER. Durante los periodos de respuestas celulares repetidas, la acumulación de iones intracelulares de calcio almacenados puede agotarse. Durante la SOCE, la depleción de los niveles de calcio en el ER desencadena una respuesta que conduce a la abertura de los canales del calcio en la membrana plasmática como se indica en la **FIGURA 15-30**. Una vez que estos canales se han abierto, los iones de $Ca^{2+}$ pueden ingresar al citosol desde donde pueden bombearse de regreso al ER, de ese modo se reponen las reservas de calcio del ER. El mecanismo responsable de la SOCE había sido un misterio no resuelto durante muchos años hasta que se descubrió que estos eventos están orquestados por sistemas de señales que operan entre el ER y la membrana plasmática. En este sistema, la disminución del $Ca^{2+}$ en el ER conduce a la agrupación dentro de la membrana del ER de una proteína sensible al $Ca^{2+}$ denominada STIM1, en regiones donde el ER y las membranas plasmáticas entran en proximidad estrecha una de la otra (25-50 nm). Luego de su reordenamiento en la membrana del ER, los grupos STIM1 actúan para reclutar las subunidades de una proteína de la membrana plasmática llamada Orai1 en regiones adyacentes de la membrana plasmática (figura 15-30). Orai1 es un canal tetramérico de iones $Ca^{2+}$, el cual se había identificado como involucrado en un tipo particular de deficiencia inmunitaria humana heredada, que resulta en una falta de $Ca^{2+}$ almacenado en los linfocitos T. El contacto entre las superficies citosólicas de las proteínas STIM1 y Orai1 en estas uniones de membrana plasmática-ER conduce a la abertura de los canales Orai1, la afluencia de $Ca^{2+}$ en los microdominios del citosol cerca de los grupos STIM1, y el rellenado de las células de depósito del ER.

## Proteínas de unión al $Ca^{2+}$

A diferencia del cAMP, cuya acción generalmente está mediada por la estimulación de una proteína cinasa, el calcio puede afectar una serie de diferentes tipos de efectos celulares, incluidas las proteínas cinasas (tabla 15-4). En dependencia del tipo de célula, los iones de calcio pueden activar o inhibir varias enzimas y sistemas de transporte, cambiar la permeabilidad iónica de las membranas inducida por la fusión de membrana, o alterar la estructura y función del citoesqueleto. El calcio no trae consigo estas respuestas por sí mismo, pero actúa en conjunto con un

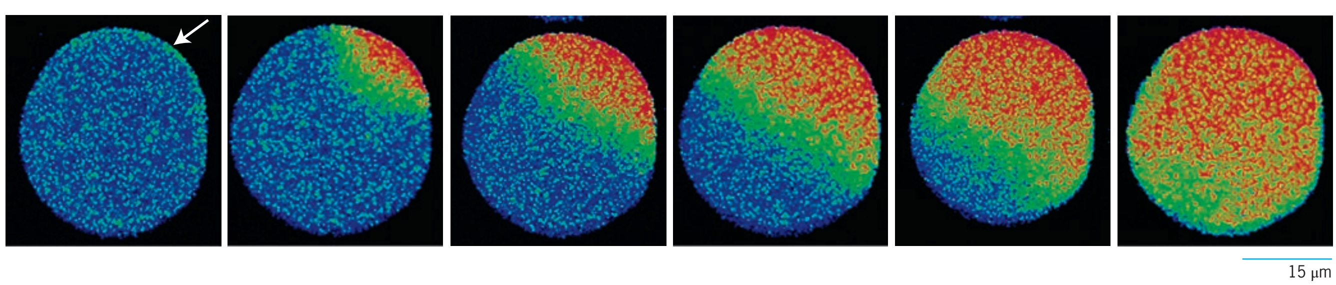



**FIGURA 15-29 Onda de calcio en un óvulo de estrella de mar inducida por un espermatozoide fecundante.** El óvulo no fecundado se inyectó con un colorante fluorescente sensible al calcio, fertilizado y fotografiado a intervalos de 10 segundos. Se observa que el aumento en la concentración de $Ca^{2+}$ se extiende desde el punto de entrada del espermatozoide (flecha) a lo largo de todo el óvulo. El color azul indica [$Ca^{2+}$] libre bajo, mientras que el color rojo indica [$Ca^{2+}$] libre alto. Una onda de $Ca^{2+}$ similar en óvulos de mamíferos se desencadena por la formación de $IP_3$ por una fosfolipasa C que se introduce en el óvulo por el esperma fecundante.

FUENTE: Cortesía de Stephen A Stricker.

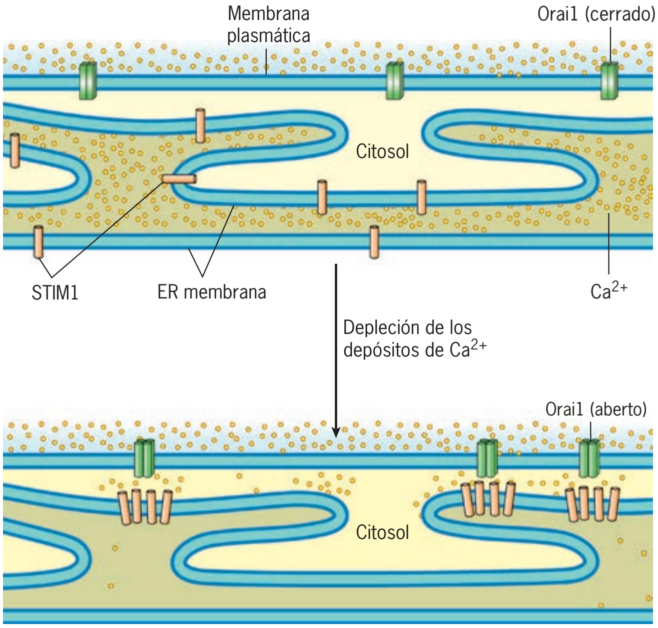



**FIGURA 15-30 Un modelo para la entrada de calcio operada por depósito.** Cuando la luz del ER contiene abundantes iones de $Ca^{2+}$, las proteínas STIM1 de la membrana ER y las proteínas Orai1 de la membrana plasmática están situadas de forma difusa en sus respectivas membranas, y el canal del calcio Orai1 está cerrado. Si las reservas del ER se agotan, un sistema de señalización funciona entre las dos membranas, lo que causa que las dos proteínas se agrupen dentro de sus respectivas membranas en estrecha proximidad entre sí. La interacción aparente entre las dos proteínas de membrana conduce a la abertura del canal Orai1 y al influjo de los iones $Ca^{2+}$ en el citosol desde donde pueden bombearse a la luz del ER.

**TABLA 15-4 Ejemplos de proteínas de mamíferos activadas por $Ca^{2+}$**

| Proteína | Función proteínica |
|---|---|
| Troponina C | Modulador de la contracción del músculo |
| Calmodulina | Modulador ubicuo de proteínas cinasas y otras enzimas (MLCK, CaM cinasa II, adenilil ciclasa I) |
| Calretinina, retinina | Activador de la guanilil ciclasa |
| Calcineurina B | Fosfatasa |
| Calpaína | Proteasa |
| PLC específico PI | Generador de $IP_3$ y diacilglicerol |
| Alfaactinina | Proteína de unión a la actina |
| Anexina | Implicada en la endo y exocitosis, y en la inhibición de la $PLA_2$ |
| Fosfolipasa $A_2$ | Productor del ácido araquidónico |
| Proteína cinasa C | Proteína cinasa ubicua |
| Gelsolina | Proteína cortadora de filamento de actina |
| Receptor $IP_3$ | Efector de la liberación de $Ca^{2+}$ intracelular |
| Receptor de rianodina | Efector de la liberación de $Ca^{2+}$ intracelular |
| Intercambiadores $Na^+/Ca^{2+}$ | Efector del intercambio de $Ca^{2+}$ por $Na^+$ a través de la membrana plasmática |
| $Ca^{2+}$ ATPasa | Bombea $Ca^{2+}$ a través de las membranas |
| Antiportadores $Ca^{2+}$ | Intercambiador de $Ca^{2+}$ por los iones monovalentes |
| Caldesmon | Regulador de la contracción del músculo |
| Villina | Inductor de actina |
| Arrestina | Terminador de la respuesta fotorreceptora |
| Calsecuestrina | Tampón de $Ca^{2+}$ |

Adaptado de DE Clapham. *Cell* 1995;80:260, con permiso de Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

número de **proteínas de unión al calcio** (los ejemplos se refieren en las pp. 291 y 351). La proteína de unión al calcio mejor estudiada es la **calmodulina**, la cual participa en muchas vías de señalización.

De modo general la calmodulina se encuentra en las plantas, los animales y en los microorganismos eucariotas, y tiene virtualmente la misma secuencia de aminoácido de un extremo del espectro eucariótico al otro. Cada molécula de calmodulina (**FIGURA 15-31**) contiene cuatro sitios de unión para el calcio. La calmodulina no tiene suficiente afinidad para unirse al ion de $Ca^{2+}$ en una célula no estimulada. Sin embargo, si la concentración de $Ca^{2+}$ se eleva en respuesta a un estímulo, los iones se unen a la calmodulina, cambiando la configuración de la proteína e incrementando su afinidad por una variedad de efectos. Dependiendo del tipo de célula, el complejo calcio-calmodulina ($Ca^{2+}$-CaM) puede unirse a una proteína cinasa, un nucleótido cíclico fosfodiesterasa, canales iónicos, o incluso al sistema de transporte del calcio de la membrana plasmática. En última instancia, ante los niveles elevados de calcio activado por el sistema responsable de la célula de exceso de cantidades de ion, este constituye un mecanismo regulador que mantiene las concentraciones bajas de calcio intracelular. El complejo $Ca^{2+}$-CaM también puede estimular la transcripción génica mediante la activación de diversas proteínas cinasas (CaMK) que fosforilan los factores de transcripción. En el caso mejor estudiado, una de estas proteínas cinasas fosforila CREB en el mismo residuo de serina que PKA (figura 15-14).

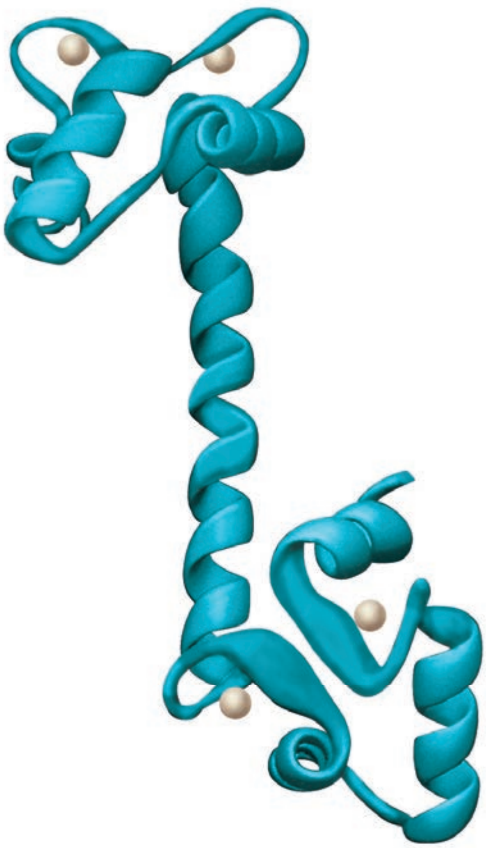


**FIGURA 15-31 Calmodulina. Un diagrama en cinta de la calmodulina (CaM, *calmodulin*) con cuatro iones de calcio unidos (esferas blancas).** La unión de estos iones $Ca^{2+}$ cambia la conformación de la calmodulina, exponiendo una superficie hidrofóbica que promueve la interacción de $Ca^{2+}$—CaM con un gran número de proteínas blanco.

FUENTE: Cortesía de Michael Carson, Universidad de Alabama en Birmingham.

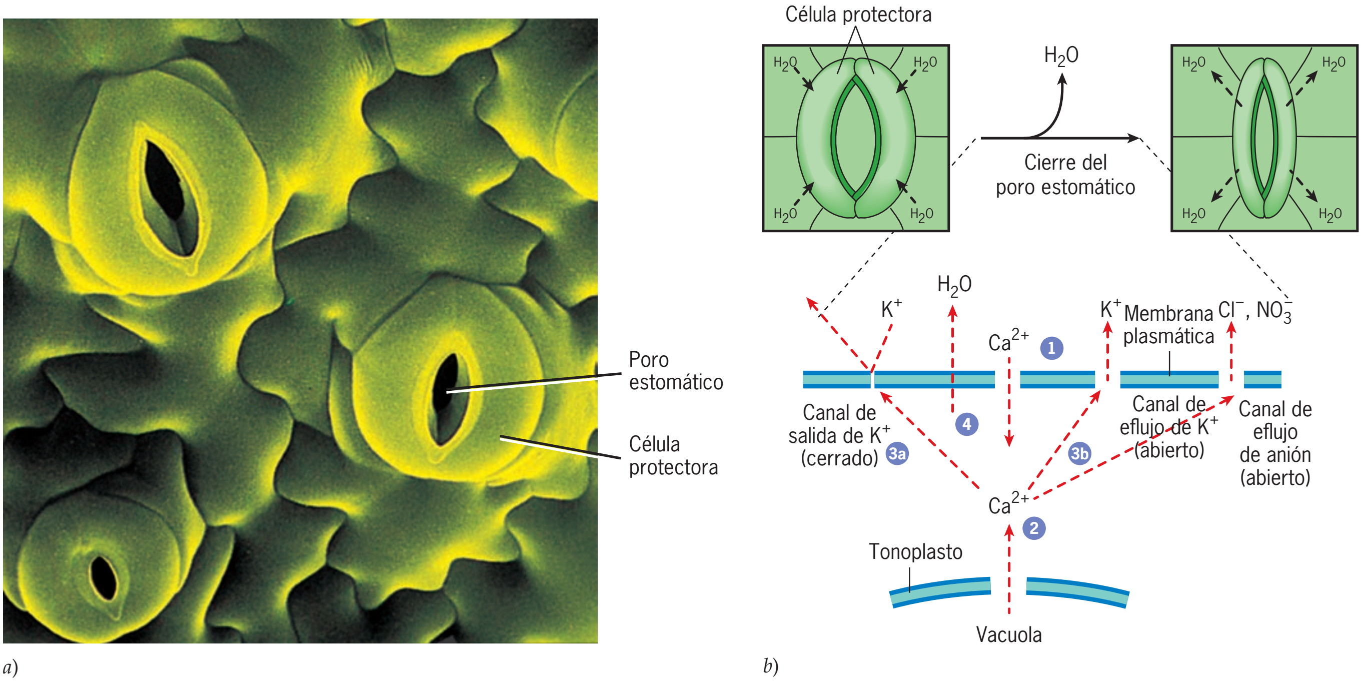



**FIGURA 15-32** Un modelo simplificado de la función de $Ca^{2+}$ en el cierre de la célula protectora. *a*) Fotografía de los poros de estomas, cada uno flanqueado por un par de células protectoras. Los estomas se mantienen abiertos debido a que la presión de la turgencia se mantiene alta dentro de las células protectoras, causando que se abulten hacia afuera como se observa aquí. *b*) Uno de los factores que controlan el tamaño del poro somático es la hormona ácido abscísico (ABA, *abscisic acid*). Cuando los niveles de ABA aumentan, se abren los canales iónicos del calcio en la membrana plasmática, lo cual permite el influjo de $Ca^{2+}$ (paso 1), que desencadena la liberación de $Ca^{2+}$ desde los almacenes internos (paso 2). La elevación subsiguiente de $Ca^{2+}$ intracelular cierra el influjo de los canales del $K^+$ (paso 3a) y abre la salida de canales del $K^+$ y aniones (paso 3b). Estos movimientos iónicos conducen a una caída en la concentración interna de solutos y a la pérdida osmótica de agua (paso 4). (La fosforilación por las proteínas cinasas también desempeñan una función en estos eventos.)

FUENTE: Dr Jeremy Burgess/photo Researchers, Inc.

## Regulación de las concentraciones de calcio en las células de las plantas

Los iones de calcio (que actúan en conjunción con la calmodulina) son importantes mensajeros intracelulares en las células de las plantas. Los niveles de calcio citosólico cambian de forma dramática dentro de ciertas células de las plantas en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo los cambios en la luz, la presión, la gravedad y la concentración de las hormonas de las plantas así como el ácido abscísico. La concentración de $Ca^{2+}$ en el citosol de una célula vegetal en reposo se mantiene muy bajo por la acción de las proteínas transportadoras situadas en la membrana plasmática y en la membrana de la vacuola (tonoplasto).

La función del $Ca^{2+}$ en la señalización de una célula de planta se ilustra en las células protectoras que regulan el diámetro de los poros microscópicos (estomas) de una hoja (**FIGURA 15-32*a***). Los estomas son los principales sitios de pérdida de agua en las plantas, y el diámetro de su abertura es controlado de forma estrecha, el cual previene la deshidratación. El diámetro de un poro del estoma decrece como la presión del fluido (turgor) disminuye en las células protectoras. A su vez, la caída de la presión de turgor es causada por una disminución en la concentración iónica (osmolaridad) de la célula protectora. Las condiciones adversas como las altas temperaturas y la baja humedad estimulan la liberación de la hormona de estrés vegetal ácido abscísico. Los estudios sugieren que el ácido abscísico se une al GPCR en la membrana plasmática de las células protectoras, desencadenando la abertura de los canales iónicos del $Ca^{2+}$ en la misma membrana (figura 15-32*b*). La afluencia resultante de $Ca^{2+}$ en el citosol provoca la liberación del $Ca^{2+}$ adicional intracelular almacenado. La concentración de $Ca^{2+}$ citosólico elevado conduce al cierre de los canales de salida de $K^+$ en la membrana plasmática y la abertura de ambos canales de flujo del $K^+$ y aniones. Estos cambios producen una red de flujo de iones $K^+$ y aniones ($NO_3^-$ y $Cl^-$) y una disminución resultante en la presión de turgor.

**REPASO**

1. ¿Cómo se mantiene el $[Ca^{2+}]$ del citosol en un nivel bajo? ¿Cómo cambia la concentración en respuesta al estímulo?
2. ¿Cuál es la función de las proteínas que se unen al calcio, como la calmodulina, para suscitar una respuesta?
3. Describa la función del calcio en la mediación del diámetro de los estomas en las células protectoras.

# 15.15 Convergencia, divergencia y comunicación cruzada entre diferentes vías de señalización

Las vías de señalización descritas anteriormente e ilustradas de forma esquemática en varias figuras representan las vías lineales que conducen de manera directa desde un receptor en la superficie de la célula hasta un blanco final. De hecho, realmente las vías de señalización en la célula son mucho más complejas. Por ejemplo:

- Las señales de varios receptores no relacionados, cada uno unido a su propio ligando, pueden *converger* para activar un efector común, como Ras o Raf.
- Las señales del mismo ligando, como EGF o insulina, pueden *divergir* para activar una variedad de efectores y vías diferentes, lo que conduce a diversas respuestas celulares.
- Las señales se pueden pasar hacia atrás o hacia adelante entre diferentes vías, un fenómeno conocido como *comunicación cruzada*.

Estas características de las vías de señalización celular se ilustran en forma de esquema en la **FIGURA 15-33**.

Las vías de señalización proporcionan un mecanismo para encaminar la información a través de una célula, no en la misma medida en que el sistema nervioso central transporta información hacia y desde los diversos órganos del cuerpo. Así como el sistema nervioso central colecta información del medio ambiente desde varios órganos de los sentidos, la célula recibe información de su medio ambiente a través de la activación de varios receptores de la superficie, los cuales actúan como sensores para detectar el estímulo extracelular. Como los órganos de los sentidos que son sensibles a formas específicas de estímulo (p. ej., la luz, la presión o las ondas sonoras), los receptores de las superficies celulares pueden unirse sólo a ligandos específicos y no son afectados por la presencia de gran variedad de moléculas no relacionadas. Una sola célula puede tener docenas de receptores diferentes enviando señales de forma simultánea al interior de la célula. Una vez que se han transmitido dentro de la célula, las señales de estos receptores pueden ser conducidas de forma selectiva a lo largo de numerosas vías de señalización diferentes, que pueden causar que una celula se divida, cambie de forma, active una vía metabólica particular, o incluso cometa suicidio (se discute en la siguiente sección). En este sentido, la célula integra la información obtenida de diferentes fuentes y organiza una respuesta apropiada y comprensiva.

Diferentes vías de señalización a menudo están interconectadas. Como resultado, las señales de una variedad de ligandos no relacionados pueden converger para activar un efector común, tal como Ras; las señales del mismo ligando pueden divergir para activar una variedad de efectores diferentes, y las señales pueden pasar atrás y avanzar entre vías diferentes (comunicación cruzada). Los siguientes casos son ejemplos de los tipos de interacciones.

1. ***Convergencia.*** Se han analizado dos tipos distintos de receptores de superficie celular en este capítulo: los receptores acoplados a la proteína G y los receptores tirosina cinasas. En el capítulo 7 se analizó otro tipo de receptor de superficie celular que es capaz de realizar la transducción de señal llamado integrinas. Aunque estos tres tipos de receptores se pueden unir a ligandos muy diferentes, todos ellos pueden conducir a la formación de fosfotirosinas en sitios de fijación para el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb2 en proximidad estrecha a la membrana plasmática (**FIGURA 15-34**). El reclutamiento del complejo Grb2-Sos causa la activación de Ras y la transmisión de señales por la vía de la MAP cinasa. Como consecuencia de esta convergencia, las señales procedentes de diversos receptores pueden conducir a la transcripción y traducción de un conjunto similar de genes promotores del crecimiento en cada célula blanco.
2. ***Divergencia.*** La evidencia de señales divergentes ha sido evidente prácticamente en todos los ejemplos de la transducción de señales descritos en este capítulo. Una mirada rápida a la figura 15-15 o 15-25*b*,*c*) ilustra cómo un simple estímulo —un ligando que se une a un GPCR o un receptor de insulina— envía señales a lo largo de una variedad de vías diferentes.
3. ***Comunicación cruzada.*** En las secciones previas, se examinó un número de vías de señalización como si cada una funcionara como una cadena de eventos independiente y lineal. De hecho, los circuitos de información que funcionan en las células son más probablemente comparados con una web interconectada en los cuales los componentes producidos en una vía pueden participar en eventos que ocurren en otras vías. Cuanto más se aprende sobre la señalización de la información en las células, más se descubre sobre la comunicación cruzada entre las vías de señalización. Más que intentar catalogar los modos en que pueden pasar la información de atrás hacia adelante dentro de una célula, se observará un ejemplo que implica el cAMP, el cual ilustra la importancia de este tipo de comunicación cruzada.

El AMP cíclico se representó anteriormente como un iniciador de una reacción en cascada que conduce a la movilización de la glucosa. Sin embargo, el cAMP también puede inhibir el crecimiento de una variedad de células, incluidos los fibroblastos y las células grasas, bloqueando las señales transmitidas a través de la cascada MAP cinasa. Se considera que el AMP cíclico efectúa esto por la activación de PKA, la cinasa dependiente de cAMP, la cual puede fosforilar e inhibir Raf, la proteína que encabeza la cascada

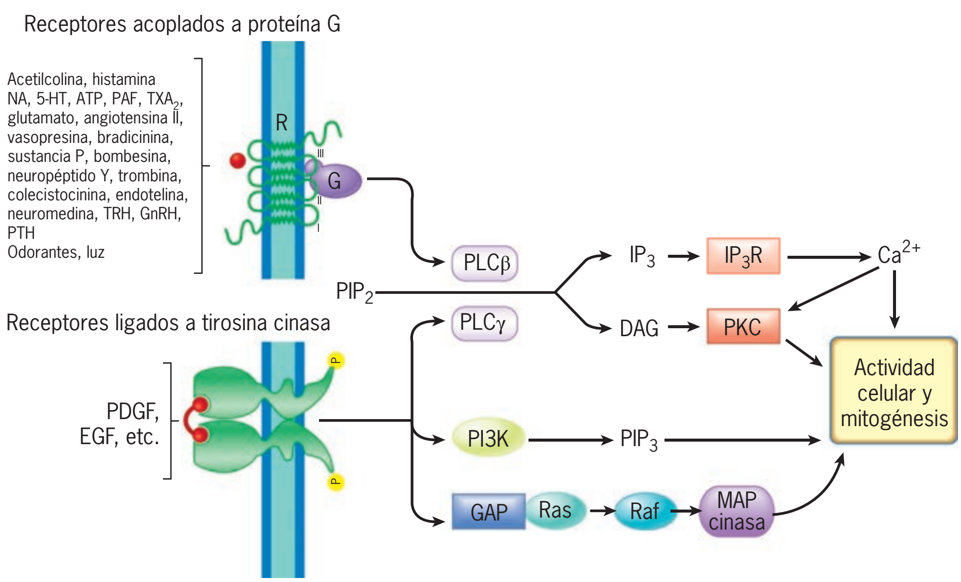



**FIGURA 15-33 Ejemplos de convergencia, divergencia y comunicación cruzada entre varias vías de transducción de señales.** En este dibujo se muestra el croquis de las vías de transducción de señales iniciadas por los receptores que actúan por medio de las proteínas G heterotriméricas y las proteínas tirosina cinasa receptora. Los dos se han visto converger por la activación de diferentes isoformas de la fosfolipasa C, que conducen a la producción de los mismos segundos mensajeros ($IP_3$ y DAG). La activación del RTK por PDGF o EGF conlleva a la transmisión de señales a lo largo de tres vías diferentes, un ejemplo de divergencia. La comunicación cruzada entre los dos tipos de vías se ilustran por los iones de calcio, los cuales se liberan del SER por la acción de $IP_3$ y luego pueden actuar sobre varias proteínas, incluida la proteína cinasa C (PKC), cuya actividad también es estimulada por DAG.

FUENTE: MJ Berridge. Reimpreso con permiso de *Nature* 1993;(361):315, copyright 1993. *Nature* por Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto vía Copyright Clearance Center.

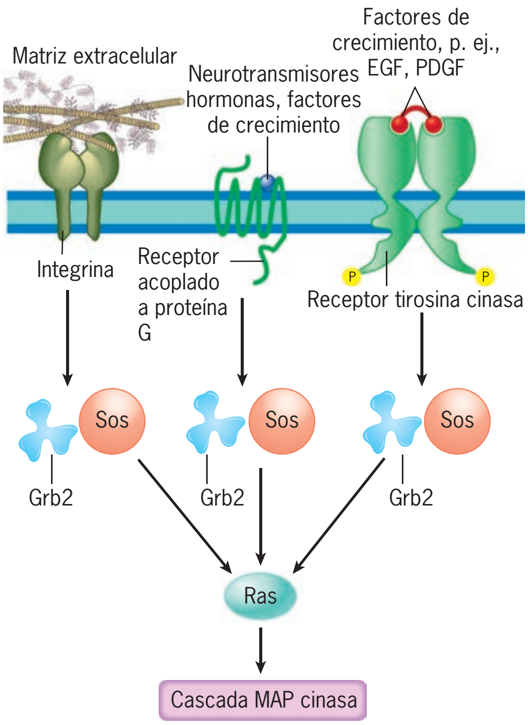



**FIGURA 15-34 Señales transmitidas desde un receptor acoplado a proteína G, una integrina y un receptor tirosina cinasa. Todos convergen en Ras, y son luego transmitidos a lo largo de la cascada MAP cinasa.**

MAP cinasa (**FIGURA 15-35**). Estas dos vías también se cruzan en otro efector de señalización importante, el factor de transcripción CREB, que se describió en la página 600 como un efector terminal de las vías mediadas por cAMP. Se asumió durante años que CREB sólo podría ser fosforilado por PKA, la cinasa dependiente de cAMP. Desde entonces se ha hecho evidente que CREB es un sustrato de un rango mucho más amplio de cinasas. Por ejemplo, una de las cinasas que fosforila CREB es Rsk-2, la cual se activa como resultado de la fosforilación por MAPK (figura 15-35). De hecho, tanto la PKA como Rsk-2 fosforilan CREB exactamente en el mismo residuo de aminoácido, Ser133, el cual debe dotar al factor de transcripción con el mismo potencial en ambas vías.

Una gran pregunta sin respuesta se plantea por estos ejemplos de convergencia, divergencia y comunicación cruzada: ¿cómo se diferencian los estímulos capaces de evocar respuestas distintas, a pesar de que utilizan vías similares? Por ejemplo, PI3K es una enzima que se activa por una notable variedad de estímulos, incluida la adhesión celular a ECM, insulina y EGF. ¿Cómo la activación de PI3K en una célula del hígado estimulada por la insulina promueve la translocación de GLUT4 y la síntesis de proteínas, mientras que la activación de PI3K en una célula adherente epitelial promueve la supervivencia celular? Por último, estas respuestas celulares contrastantes deben ser debido a diferencias en la proteína de tipos de células de diferente composición. Probablemente, parte de la respuesta radica en el hecho de que células diferentes poseen isoformas diversas de estas distintas proteínas, incluso PI3K. Algunas de estas isoformas son codificadas por diferentes genes, pero que se encuentran relacionados; mientras otras son generadas por un empalme alternativo (sección 12.18), u otros mecanismos. Diferentes isoformas de PI3K, PKB, o PLC, por ejemplo, pueden unirse a distintos conjuntos de componentes corriente arriba y abajo, lo cual podría permitir similares vías para evocar distintas respuestas. La variación en las respuestas suscitada por diferentes células, las cuales están provistas de proteínas de señalización similares, puede también ser en parte explicada por la presencia de diferentes proteínas de andamiaje en cada tipo de célula. Como se muestra en la figura 15-23, la especificidad de una respuesta puede ser orquestada por los andamios con los cuales

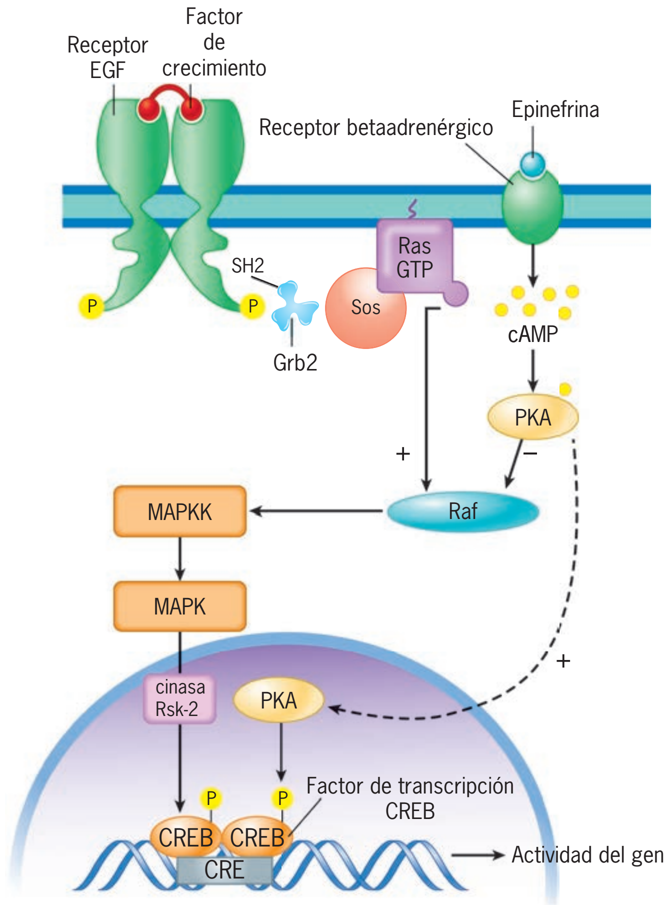



**FIGURA 15-35 Un ejemplo de comunicación cruzada entre dos principales vías de señalización.** El AMP cíclico actúa en algunas células, por medio de la cinasa PKA dependiente de cAMP, para bloquear la transmisión de señales de Ras a Raf, que inhibe la activación de la cascada MAP cinasa. Además, tanto PKA como las cinasas de la cascada MAP cinasa fosforilan el factor de transcripción CREB en el mismo residuo de serina, activando el factor de transcripción y permitiendo que se una a sitios específicos en el DNA.

las proteínas de señalización pueden interactuar. Pero no es probable que las variaciones en las isoformas y los andamios puedan explicar completamente la extraordinaria diversidad de respuestas celulares, más que las diferencias en las estructuras de las neuronas pueden explicar el rango de respuestas evocadas por el sistema nervioso. Con suerte, como las vías de señalización de más células se describen, se obtendrá una mejor comprensión de la especificidad de lo logrado mediante el uso de moléculas de señalización similares.

## REPASO

1. ¿Qué se entiende por el término *comunicación cruzada* en la proteína de señalización? ¿Qué se puede entender por convergencia y divergencia?

## 15.16 La función del NO como mensajero intercelular

Durante la década de 1980 se descubrió un nuevo tipo de mensajero que no era ningún compuesto orgánico, como cAMP, ni un ion, como el $Ca^{2+}$, era un gas inorgánico, el óxido nítrico (NO, *nitric oxide*). El NO es inusual debido a que funciona tanto como un mensajero extracelular, como medio de comunicación intercelular, como un segundo mensajero, actuando dentro de la célula en la cual es generado. El NO se forma del aminoácido L-arginina en una reacción que requiere oxígeno y NADPH, y que se cataliza

por la enzima de la óxido nítrico sintasa (NOS, *nitric oxide synthase*). Desde su descubrimiento, se ha hecho evidente que el NO está involucrado en una gran cantidad de procesos biológicos que incluyen la anticoagulación, la neurotransmisión, la relajación del músculo liso y la percepción visual.

Como con muchos otros fenómenos biológicos, el descubrimiento de la función del NO como una molécula mensajera comenzó con una observación accidental. Se había conocido desde muchos años que la acetilcolina actuaba en el cuerpo para relajar las células del músculo liso de los vasos sanguíneos, pero la respuesta no pudo ser duplicada *in vitro*. Cuando las partes de un vaso sanguíneo principal como la aorta se incubaban en concentraciones fisiológicas de la acetilcolina *in vitro*, la preparación generalmente mostraba poca o ninguna respuesta. A fines de la década de 1970, Robert Furchgott, un farmacólogo de un centro médico del estado de Nueva York, estaba estudiando la respuesta *in vitro* de fragmentos de aorta de conejo ante diversos agentes. En sus estudios anteriores, Furchgott había utilizado tiras de aorta que habían sido disecadas del órgano. Por razones técnicas, Furchgott cambió las tiras del tejido aórtico por anillos aórticos, y descubrió que las nuevas preparaciones respondían a la acetilcolina con la relajación experimentada. Posteriormente, la investigación reveló que las tiras habían fallado en exponer la respuesta de relajación, debido a que la delicada capa endotelial que recubre la aorta había sido borrada durante la disección. Este sorprendente hallazgo sugirió que las células endoteliales estuvieran de algún modo involucradas en la respuesta de las células musculares adyacentes. En estudios posteriores se encontró que la acetilcolina se une a los receptores de la superficie de las células endoteliales, conduciendo a la producción y liberación de un agente, que se difunde mediante las células de la membrana plasmática y causa la relajación de las células musculares. La relajación del agente difusible se identificó en 1986 como óxido nítrico, por Louis Ignarro en la UCLA, y por Salvador Moncada, en los laboratorios de investigación Wellcome en Inglaterra. Los pasos de la respuesta de relajación inducida por la acetilcolina se ilustran en la **FIGURA 15-36**.

La unión de la acetilcolina a la superficie externa de una célula endotelial (paso 1, figura 15-36) señala un aumento en la concentración del $Ca^{2+}$ citosólico (el paso 2) que activa la sintasa óxido nítrico (el paso 3). El NO formado en la célula endotelial se difunde a través de la membrana plasmática y en las células adyacentes del músculo liso (el paso 4), donde se une y estimula a la guanilil ciclasa (el paso 5), la enzima que sintetiza GMP cíclico (cGMP, *cyclic GMP*), el cual es un importante segundo mensajero similar en estructura al cAMP. El cGMP se une a una proteína cinasa dependiente de cGMP (una PKG), que fosforila sustratos específicos causando la relajación de la célula del músculo (el paso 6) y la dilatación del vaso sanguíneo.

## El NO como un activador de guanilil ciclasa

El descubrimiento de que el NO actúa como un activador de la guanilil ciclasa fue realizado a finales de la década de 1970 por Ferid Murad y sus colegas de la Universidad de Virginia. Murad estaba trabajando con azida ($N_3$), un potente inhibidor del transporte de electrones y, por casualidad, descubrió la molécula estimulada por la producción de cGMP en los extractos celulares. Finalmente Murad y sus colegas demostraron que la azida se estaba convirtiendo de forma enzimática dentro del óxido nítrico, el cual funciona como el actual activador de la guanilil ciclasa. Además, estos estudios explicaron la acción de la nitroglicerina, la cual había sido usada desde la década de 1860 para tratar el dolor de angina que se produce por un fluir inadecuado de la sangre al corazón. La nitroglicerina se metaboliza a óxido nítrico, lo cual estimula la relajación de los músculos lisos que revisten los vasos sanguíneos del corazón, incrementando el flujo sanguíneo del órgano. Los beneficios terapéuticos de la nitroglicerina fueron descubiertos mediante una interesante observación. Las personas con enfermedades del corazón, quienes trabajaban con la nitroglicerina en la fábrica de dinamita de Alfred Nobel, se percataron de que padecían más angina cuando no estaban trabajando. Es conveniente señalar que el Premio Nobel, que está financiado por la donación de los bienes de Alfred Nobel, se entregó en 1998 por el descubrimiento del NO como un agente de señalización.

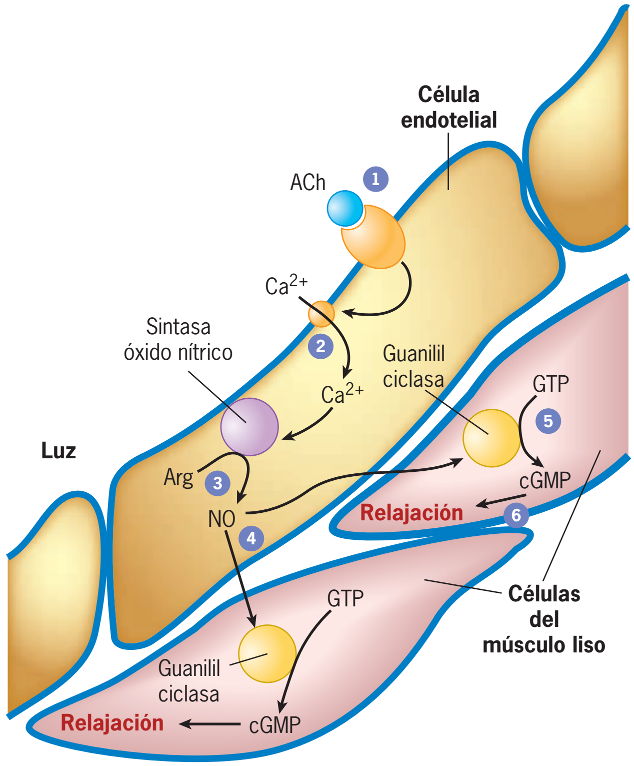



**FIGURA 15-36 Una vía de transducción de señales que opera por medio del NO y el GMP cíclico que conduce a la dilatación de los vasos sanguíneos.** Los pasos ilustrados en la figura se describen en el texto.

FUENTE: Tomada de RG Knowles y S Moncada. *Trends Biochem Science* 1992;17:401. Tendencias en Ciencias Bioquímicas por la Unión Internacional de Bioquímica reproducida con permiso de Elsevier Ltd en formato reutilización en un libro/libro de texto vía Copyright Clearance Center.

## Inhibición de las fosfodiesterasas

El descubrimiento del NO como un segundo mensajero también ha conducido al desarrollo del viagra (el sildenafilo). Durante la excitación sexual, las terminales nerviosas del pene liberan NO, el cual causa la relajación de las células del músculo liso que reviste los vasos sanguíneos del pene y congestionan el órgano con la sangre. Como se describió anteriormente, el NO media esta respuesta en las células del músculo liso por la activación de la enzima guanilil ciclasa y la subsecuente producción de cGMP. El viagra (y relacionado con fármacos) no tiene efecto en la liberación de NO o en la activación de la guanilil ciclasa, pero sí actúa como un inhibidor de la cGMP fosfodiesterasa, la enzima que destruye el cGMP. La inhibición de esta enzima conduce al mantenimiento de niveles elevados de cGMP, el cual promueve el desarrollo y mantenimiento de una erección. El viagra es totalmente específico para una isoforma particular de la cGMP fosfodiesterasa, la PDE5, la cual es la versión que actúa en el pene. Otra isoforma de la enzima, la PDE3, desempeña una función clave en la regulación de la contracción del músculo cardiaco, pero desafortunadamente no se inhibe por el fármaco. El viagra fue descubierto cuando una medicación potencial para la angina presentó efectos adversos inesperados.

Recientes investigaciones han revelado que el NO tiene una variedad de acciones dentro del cuerpo que no involucran la pro-

ducción de cGMP. Por ejemplo, se agrega al grupo SH de ciertos residuos de cisteína en más de cien proteínas, incluyendo la hemoglobina, Ras, los canales de rianodina y las caspasas. Esta modificación postraduccional, la cual se denomina *S-nitrosilación*, altera la actividad, la rotación o las interacciones de la proteína.

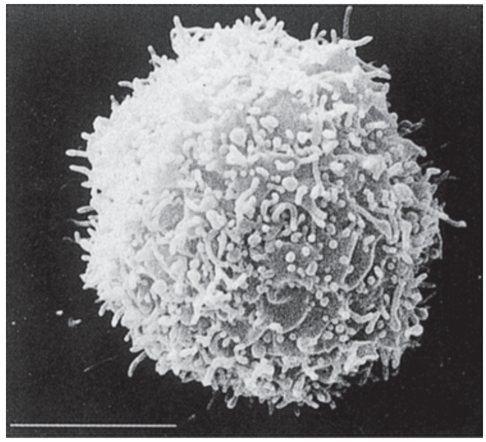
**REPASO**

1. Describa los pasos en la vía de señalización por los cuales el óxido nítrico media la dilatación de los vasos sanguíneos.

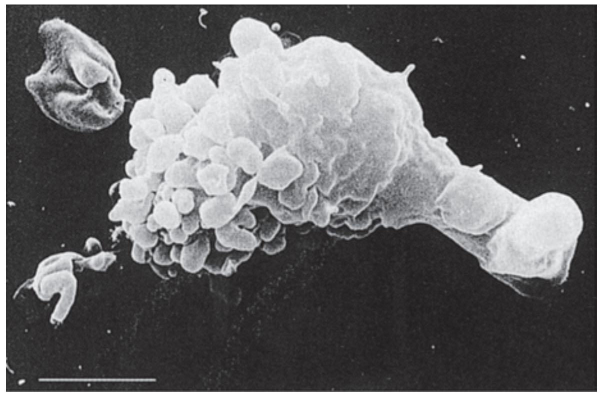
## 15.17 Apoptosis (muerte celular programada)

La **apoptosis** o muerte celular programada es un proceso normal, exclusivo de las células animales. La apoptosis ocurre mediante una secuencia orquestada de eventos que conduce a la muerte de una célula. La muerte por apoptosis es un proceso limpio y ordenado (**FIGURA 15-37**) caracterizado por la contracción general en el volumen de la célula y su núcleo, la pérdida de adhesión a las células vecinas, la formación de ampollas en la superficie celular, la disección de la cromatina dentro de pequeños fragmentos, y el englobe rápido de los "restos" por fagocitosis. La apoptosis a menudo se contrasta con un tipo diferente de muerte celular llamada *necrosis*, la cual en general sigue algún tipo de trauma físico o ataque bioquímico. Como la apoptosis, la necrosis también puede desarrollarse como un proceso regulado y programado (denominado necroptosis), a pesar de que es mucho menos ordenado en la naturaleza. La necrosis se caracteriza por la inflamación tanto de la célula como de sus organelos membranosos internos, la rotura de la membrana, la fuga del contenido celular hacia el medio, y la inducción de inflamación. La apoptosis, al ser un proceso seguro y ordenado, podría ser comparada con el estallido controlado de un edificio con el uso cuidadoso de explosivos situados en el lugar, o simplemente volar la estructura sin preocuparse por lo que ocurra con los escombros que vuelan.

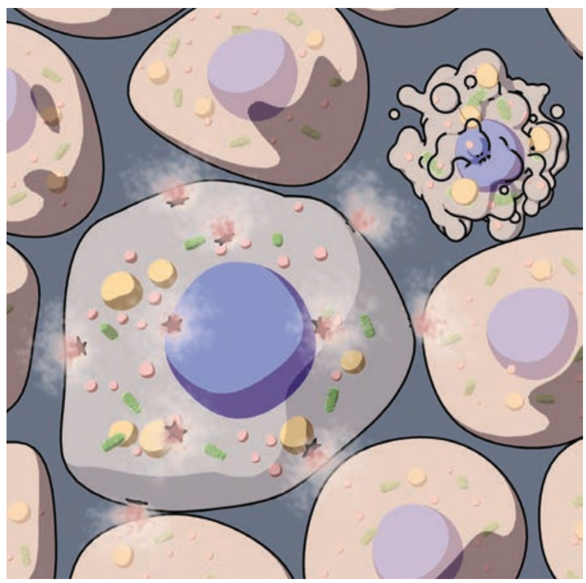
¿Por qué nuestros cuerpos tienen células no deseadas y dónde encontramos las células que se convierten en blanco de eliminación? La respuesta corta es: casi donde sea que mire. Durante el desarrollo embrionario, lo primero es la forma de la mano humana que se asemeja a una paleta sin ningún espacio entre los tejidos que se convertirán en los dedos. Los dedos son esencialmente modelados fuera de la paleta mediante la vía de eliminación del exceso de células por la apoptosis. Tres etapas de este proceso, como ocurre en los ratones, se ilustran en la **FIGURA 15-38**. Los linfocitos T son células del sistema inmunitario, que reconocen y destruyen las células blanco anormales o infectadas con patógenos. Estas células blanco se reconocen por sus receptores específicos, que están presentes en la superficie de los linfocitos T. Los linfocitos que se producen durante el desarrollo embrionario poseen receptores capaces de la unión estrecha a proteínas presentes en las superficies de células *normales* dentro el cuerpo. Los linfocitos T que ostentan una capacidad peligrosa son eliminados por la apoptosis (véase figura 17-25), la cual no se detiene con el fin del desarrollo embrionario. Se ha estimado que $10^{10}$-$10^{11}$ células del cuerpo de un adulto mueren todos los días por la apoptosis. Por ejemplo, la apoptosis está involucrada en la eliminación de las células que tienen daño genómico irreparable sostenido. Esto es importante porque el daño al anteproyecto genético puede causar una división celular no regulada y el desarrollo del cáncer. Además, la apoptosis es responsable de la muerte de las células que no requieren de más tiempo, como las células T activadas, que han respondido a un agente infeccioso, el cual ha sido eliminado. Finalmente, la apoptosis parece estar involucrada con las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y enfermedad de



*a*)



*b*)



*c*)

**FIGURA 15-37 Una comparación de células normales y apoptóticas.** *a*, *b*) Micrografías electrónicas de barrido de una célula T hibridoma normal *a*) y apoptótica *b*). La célula apoptótica exhibe muchas ampollas en la superficie que están injertadas fuera de la célula. La barra es igual a 4 mm. c) Ilustración de las diferencias morfológicas distintivas entre una célula sometida a apoptosis (arriba a la derecha) y la necroptosis (centro).

FUENTE: *a-b*) Tomada de SJ Martin, *et al*. *Trends Biochem Sci* 1994;19:28. Reimpreso con permiso de Elsevier.

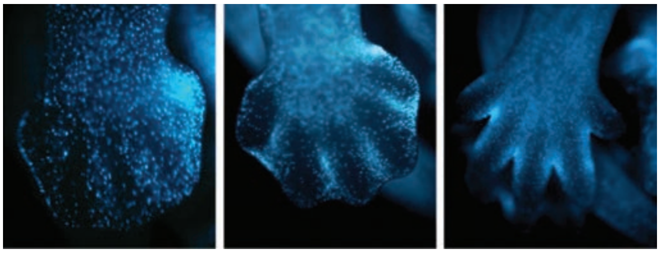


**FIGURA 15-38 La apoptosis modela la estructura digital de los mamíferos.** Tres etapas en este proceso en un embrión de ratón. En este ratón en particular, el cual se llama ratón MacBlue, todos los macrófagos embrionarios expresan la proteína fluorescente cian. Los macrófagos fluorescentes se han infiltrado en las regiones de la almohadilla de la pata donde la apoptosis ha ocurrido y se limpia el espacio entre los dígitos.

FUENTE: Tomada de David A Hume. *Nature Immunol* 2008;9:13; © 2008, Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited.

Huntington. La eliminación de neuronas esenciales durante la progresión de la enfermedad produce el ascenso de la pérdida de memoria o la disminución de la coordinación. Estos ejemplos muestran que la apoptosis es importante en la conformación de los tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario, y en el mantenimiento de la homeostasis en los cuerpos de los animales adultos. Las enfermedades graves pueden originarse en la falla, al efectuarse la apoptosis cuando la eliminación de células es apropiada (p. ej., las células cancerosas) y en la alta inducción de la apoptosis, al no ser apropiada la eliminación de las células (p. ej., la diabetes tipo 1).

El término *apoptosis* fue acuñado en 1972 por John Kerr, Andrew Wylie, y A. R. Currie de la Universidad de Aberdeen, Escocia, en un documento que describe por primera vez los eventos coordinados que ocurrieron durante la muerte programada de un amplio rango de células. La comprensión de la base molecular de la apoptosis se reveló por vez primera en los estudios sobre el gusano nemátodo *C. elegans*, cuyas células pueden seguirse con absoluta precisión durante el desarrollo embrionario. De 1 090 células producidas durante el desarrollo de este gusano, 131 están destinadas normalmente a morir por la apoptosis. En 1986 Robert Horvitz y sus colegas del Instituto Tecnológico de Massachusetts descubrieron que los gusanos efectuaban una mutación en el gen *CED-3* en el que procede el desarrollo de principio a fin sin la pérdida de sus células por la apoptosis. Estos hallazgos sugirieron que el producto del gen *CED-3* desempeña una función crucial en el proceso de la apoptosis en este organismo. La identificación del gen *CED-3* en los nemátodos conduce al descubrimiento de una familia homóloga de proteínas en los mamíferos, la cual ahora se denomina **caspasa**. Esta es un grupo distintivo de cisteínas proteasas (es decir, cisteínas proteasas con un residuo de cisteína clave en su sitio catalítico) que son activadas en las etapas tempranas de la apoptosis y son responsables de desencadenar la mayoría, si no todos, de los cambios observados durante la muerte celular. Las caspasas efectúan esta actividad por la rotura de un selecto grupo de proteínas esenciales. Entre los blancos de las caspasas están los siguientes:

- *Más de una docena de proteínas cinasas, incluida la cinasa de adhesión focal (FAK), PKB, PKC y Raf1*. La inactivación de FAK, por ejemplo, se presume que interrumpe la adhesión celular, lo que conduce a la separación de la célula apoptótica de sus vecinas. La inactivación de ciertas cinasas, como la PKB, sirve para interrumpir las vías de señalización de prosupervivencia. Las caspasas también interrumpen la generación de señales de supervivencia con la inactivación de la vía NF-κB (p. 625).
- *Láminas*, que forman el revestimiento interior de la envoltura nuclear. La eliminación de las láminas conduce al desamblaje de la lámina nuclear y al encogimiento del núcleo.
- *Las proteínas del citoesqueleto*, como las de los filamentos intermedios, la actina, la tubulina y la gelsolina. La escisión y la consiguiente activación de estas proteínas conducen a los cambios en la forma de la célula.
- *Una endonucleasa llamada caspasa activada por DNasa (CAD)*, la cual se activa después de la escisión de la caspasa de una proteína inhibidora. Una vez activada, la CAD se transloca del citoplasma al núcleo, donde ataca al DNA, seccionándolo en fragmentos.

Estudios recientes se han centrado en los eventos que conducen a la activación de un programa de célula suicida. La apoptosis puede desarrollarse, por tanto, por estímulos internos como las anormalidades en el DNA, como por estímulos externos como ciertas citocinas (proteínas secretadas por células del sistema inmunitario). Por ejemplo, las células epiteliales de la próstata se convierten en apoptóticas cuando se privan de la testosterona de la hormona sexual masculina. Esta es la razón por la cual el cáncer de próstata que se ha extendido a otros tejidos es frecuente tratarlo con fármacos que interfieran con la producción de la testosterona. Los estudios indican que los estímulos externos activan la apoptosis por una vía de señalización, denominada *vía extrínseca*, la cual es distinta a la utilizada en el estímulo interno denominada *vía intrínseca*. Se discutirán por separado las vías extrínseca e intrínseca. Sin embargo, se debe precisar que existe una comunicación cruzada entre estas vías y que las vías apoptóticas extracelulares pueden causar la activación de la vía intrínseca.

## La vía extrínseca de la apoptosis

Los pasos en la vía extrínseca se ilustran en la **FIGURA 15-39**. En el caso representado en la figura, el estímulo para la apoptosis se origina mediante una proteína mensajera extracelular llamada factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), que se denominó así por su capacidad para destruir las células tumorales. El TNF es una proteína trimérica producida por ciertas células del sistema inmunitario en respuesta a condiciones adversas, como la exposición a la radiación ionizante, la temperatura elevada, la infección viral o los agentes químicos tóxicos, por ejemplo, aquellos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer. Al igual que otros tipos de primeros mensajeros tratados en este capítulo, el TNF evoca su respuesta al enlace a un receptor transmembrana, el TNFR1. La proteína trimérica TNF1 es miembro de una familia de "receptores de la muerte" relacionados con el proceso apoptótico. El dominio citoplásmico de cada subunidad del receptor TNF contiene un segmento de alrededor de 70 aminoácidos llamado "dominio de la muerte" (cada segmento es verde en la figura 15-39) que media las interacciones proteína-proteína. La unión del TNF al receptor trimérico produce un cambio en la conformación del dominio del receptor de la muerte, el cual conduce al reclutamiento de varias proteínas, como se indica en la figura 15-39.

Las últimas proteínas que se unen al complejo que se ensambla en la superficie interna de la membrana plasmática son dos moléculas de procaspasa-8 (figura 15-39). Estas proteínas se denominan "procaspasas" porque cada una es un precursor de una caspasa; contiene una porción extra (nombrada región pro) que debe eliminarse mediante un proceso proteolítico para activar la enzima. La síntesis de las caspasas como proenzimas protege la célula del daño proteolítico accidental. A diferencia de la mayoría de las proenzimas, las procaspasas exhiben un nivel bajo de actividad proteolítica. De acuerdo con un modelo, cuando dos o más procaspasas son retenidas en asociación estrecha una con respecto a la otra, como están en la figura 15-39, son capaces de la escisión de una u otra cadena de polipéptidos y de convertir la otra molécula en una caspasa completamente activa. La enzima madura final (es decir, la caspasa-8) contiene cuatro cadenas polipeptídicas derivadas de dos procaspasas precursoras como se ilustra en la figura.

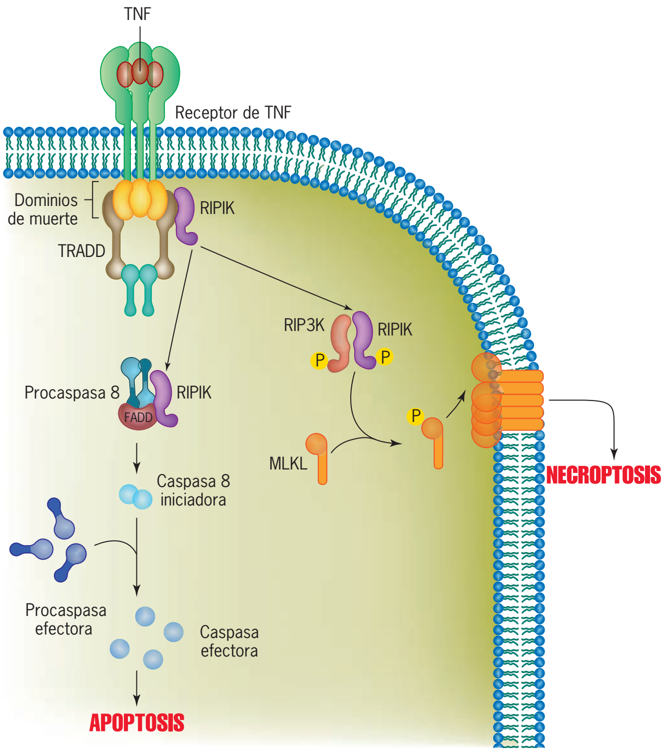



**FIGURA 15-39 Un modelo simplificado de la vía extrínseca (mediada por receptor) de la apoptosis y la vía necroptótica.** Cuando el TNF se une a un receptor TNF (TNFR1), el receptor activado se une a la proteína adaptadora citoplasma TRADD y a la señalización de proteínas adicionales, incluyendo la cinasa RIP1K. Los dominios citoplásmicos del receptor TNF, FADD, TRADD y RIP1K interactúan entre sí por regiones homólogas denominadas dominios de muerte que están presentes en cada proteína. En la vía apoptótica, la RIP1K se asocia con la proteína adaptadora FADD y procaspasa-8. Una vez ensamblados en el complejo, dos moléculas de la procaspasa se rompen una con otra para generar una molécula de caspasa-8 activa que contiene cuatro segmentos polipéptidos. La caspasa-8 es un complejo iniciador que activa la caspasa corriente (efectora) corriente abajo que ejecuta la sentencia de muerte. En la vía necroptótica, el RIP1K se asocia con otra cinasa, la RIP3K, al formar el necroptosoma activo. Se considera la fosforilación RIP3K de la MLKL para permitir que la MLKL se transloque a la membrana y se oligomerice para formar los canales que permiten la fuga citoplásmica. Se puede señalar que la interacción entre TNF y TNFR1 también puede conducir a la supervivencia celular en vez de a la autodestrucción (p. 624).

La activación de la caspasa-8 es similar en principio a la activación de las efectoras por una hormona o factor de crecimiento. En todas estas vías de señalización la unión a un ligando extracelular causa un cambio en la conformación de un receptor, que conduce a la unión y activación de proteínas situadas en la vía corriente abajo. La caspasa-8 se describe como una caspasa *iniciadora* debido a que inicia la apoptosis por escisión y activación corriente abajo, o la caspasa *efectora*, la cual ejecuta la autodestrucción controlada de la célula como se describió anteriormente.

## La vía intrínseca de la apoptosis

Los estímulos internos, como el daño genético irreparable, la falta de oxígeno (la hipoxia), las concentraciones extremadamente altas del $Ca^{2+}$ citosólico, las infecciones virales, el estrés del ER, o estrés oxidativo grave (es decir, la producción de grandes cantidades de radicales libres destructivos), desencadenan la apoptosis por la vía intrínseca ilustrada en la **FIGURA 15-40**. La activación de la vía intrínseca se regula por los miembros de la familia de las proteínas Bcl-2, la cual se caracteriza por la presencia de uno o más dominios BH pequeños. La familia de miembros Bcl-2 puede ser subdividida en tres grupos: 1) miembros proapoptóticos (que contienen varios dominios BH) los cuales promueven la apoptosis (Bax y Bak), 2) miembros antiapoptóticos (que contienen varios dominios BH) los cuales protegen a las células de la apoptosis (p. ej., Bcl-$x_L$, Bcl-w y Bcl-2),[3] y 3) sólo proteínas BH3 (así llamadas porque contienen sólo un dominio BH), que promueven la apoptosis por un mecanismo indirecto. De acuerdo con el criterio predominante, sólo las proteínas BH3 (p. ej., Bid, Bad, Puma y Bim) pueden ejercer su efecto proapoptótico de dos maneras diferentes, dependiendo en particular de las proteínas involucradas. En algunos casos promueven la apoptosis por la inhibición antiapoptótica de los miembros de la Bcl-2, mientras que en otros casos promueven la apoptosis mediante la activación proapoptótica de Bax o Bak. En cualquier caso, sólo las proteínas BH3 son los determinantes probables de si una célula sigue una vía de supervivencia o la muerte. En una célula saludable, las proteínas BH3 están ausentes o inhibidas de forma marcada, y las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 pueden contener a los miembros proapoptóticos. El mecanismo por el cual esta ocurre se debate. Es solamente frente a ciertos tipos de estrés que las proteínas BH3 se expresan o activan, de este modo cambian el equilibrio en dirección de la apoptosis. En estas circunstancias, los efectos restrictivos de las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas se anulan, y la proteína Bax proapoptótica está libre para translocar desde el citosol a la membrana mitocondrial externa (OMM, *outer mitochondrial membrane*). A pesar de que el mecanismo no es completamente claro, se considera que las moléculas Bax (y/o las moléculas Bak, las cuales son residentes permanentes en la OMM) se someten a un cambio en conformación que causa que se ensamble dentro una multisubunidad, el canal recubierto por proteína dentro de la OMM. Una vez formado, este canal incrementa de forma dramática la permeabilidad de la OMM y promueve la liberación de ciertas proteínas mitocondriales, la más notable el citocromo *c*, el cual reside en el espacio intermembranoso (véase figura 5-17). Casi todas las moléculas citocromo *c* presentes en todas las células mitocondriales pueden ser liberadas de una célula apoptótica en un periodo tan corto como 5 minutos. Las células carentes de *ambos* Bax y Bak están protegidas de la apoptosis, revelando funciones esenciales de estas proteínas proapoptóticas en este proceso.

La liberación de proteínas mitocondriales proapoptóticas tales como el citocromo *c* es aparentemente el "punto de no retorno", es decir, un evento que de manera irreversible compromete la célula a la apoptosis. Una vez en el citosol, el citocromo *c* forma parte de un complejo multiproteico en forma de rueda llamado *apoptosoma*, que también incluye varias moléculas de procaspasa-9. Se cree que las moléculas de procaspasa-9 pueden llegar a ser activadas por la simple unión al complejo multiproteico y no requieren de una rotura proteolítica (figura 15-40). Al igual que la caspasa-8, la cual es activada por la vía mediada por el receptor descrita anteriormente, la 9 es una caspasa iniciadora que activa las caspasas efectoras corriente abajo, la cual trae consigo la apoptosis.[4] Por último, las vías extrínsecas (mediadas por el receptor) e intrínsecas (mediadas por la mitocondria) convergen para la activación de las mismas caspasas efectoras, las cuales escinden los mismos blancos celulares.

A medida que las células ejecutan el programa apoptótico, pierden contacto con sus vecinas y comienzan a contraerse. Finalmente, la célula se desintegra en un cuerpo apoptótico condensado y cerrado por la membrana. Todo este programa apoptó-

[3] El primer miembro de la familia en sí misma, la Bcl-2, fue identificado originalmente en 1985 como un oncogén causante del cáncer de los linfomas humanos. El gen que codifica Bcl-2 estaba sobreexpresado en estas células malignas como consecuencia de una translocación. Actualmente se comprende que la Bcl-2 actúa como un oncogén para promover la supervivencia de células potencialmente cancerosas, lo contrario podría desencadenar la muerte por apoptosis.

[4] También se han descrito las vías intrínsecas que son independientes de Apaf-1 y la caspasa-9, y posiblemente las independientes del citocromo c.

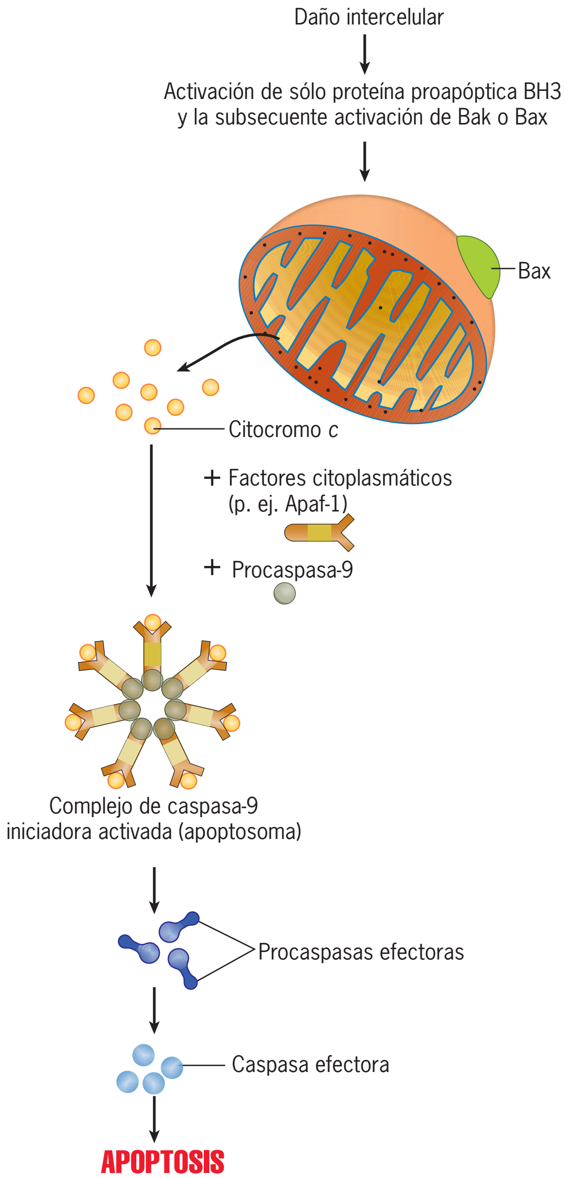



**FIGURA 15-40 La vía intrínseca (mediada por mitocondrias) de apoptosis.** Varios tipos de estrés celular causan miembros proapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, Bax o Bak, para oligomerizarse en la membrana mitocondrial externa, formando canales que facilitan la liberación de moléculas del citocromo *c* del espacio intermembranoso. Una vez en el citosol, las moléculas del citocromo *c* forman un complejo multisubunidad con una proteína citosólica denominada Apaf-1 y las moléculas procaspasa-9. Ellas están aparentemente activadas a su capacidad proteolítica completa como resultado de un cambio conformacional inducido por asociación con Apaf-1. Las moléculas caspasa-9 rompen y activan las caspasas efectoras, las cuales efectúan la respuesta apoptótica. La vía intrínseca se puede activar en algunas células (p. ej., los hepatocitos) por las señales extracelulares. Esto ocurre con la caspasa iniciadora de la vía extrínseca, la caspasa-8, la cual escinde sólo la proteína BH3 llamada Bid, generando un fragmento de proteína (tBid) que se une a Bax, e induce la inserción de Bax en la OMM y libera el citocromo *c* de las mitocondrias.

tico se puede ejecutar en menos de 1 hora. Los cuerpos apoptóticos son reconocidos por la presencia de fosfatidilserina en su superficie. La fosfatidilserina es un fosfolípido, la cual está normalmente sólo presente en la lámina interna de la membrana citoplasmática.

Durante la apoptosis, un fosfolípido "escramblasa" mueve las moléculas de la fosfatidilserina a la lámina externa de la membrana plasmática, donde se reconocen como una señal de "comerme" por los macrófagos especializados. Por tanto, la muerte celular apoptótica ocurre sin derramar el contenido celular en el entorno extracelular (**FIGURA 15-41**). Esto es importante porque la liberación de desechos celulares puede desencadenar inflamación, la cual puede causar daño tisular significativo.

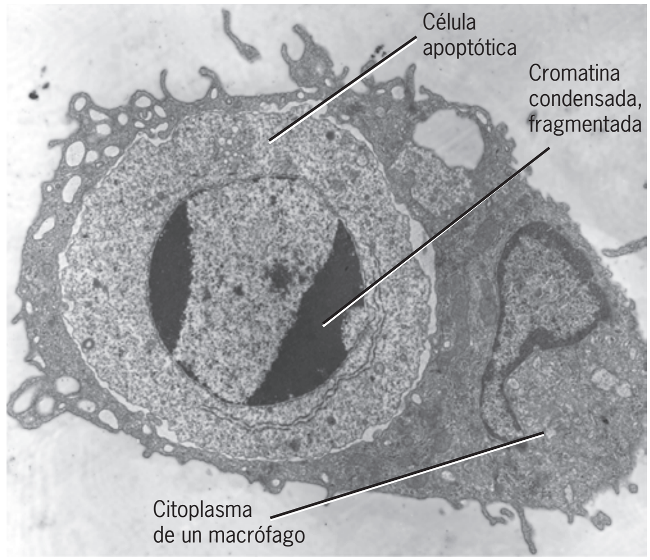



**FIGURA 15-41 La eliminación de las células apoptóticas se logra mediante la fagocitosis.** En esta micrografía electrónica se muestra un "cadáver" celular apoptótico dentro del citoplasma de un fagocito. Tenga en cuenta la naturaleza compacta de la célula englobada y el estado denso de su cromatina.

FUENTE: Tomado de Peter M Henson, Donna L Bratton, y Valerie A Fadok. *Curr Biol* 2001;11:R796, fig. 1a, © 2001, con permiso de Elsevier.

## Necroptosis

A diferencia de la apoptosis, la muerte celular necróptica provoca la rotura de la membrana plasmática, causando contenidos celulares que son derramados dentro del ambiente, y a menudo desencadenando una respuesta inflamatoria, que con frecuencia puede ser beneficiosa, por ejemplo, como un medio de guía inmunitaria de células a un sitio de infección. Sin embargo, la mala regulación de la vía necróptica es sospechosa de desencadenar enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn y la inflamatoria del intestino.

Comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la necroptosis es actualmente una zona activa de investigación. Estudios recientes han demostrado que la necroptosis puede ser disparada por la misma señal —TNF unido al receptor TNF—, lo cual además conduce a la vía extrínseca de la apoptosis. Sin embargo, en la vía necróptica la caspasa 8 no es la última activada. Más bien, una serie de interacciones conduce al reclutamiento de las cinasas RIPK1 y RIPK3, las cuales están concebidas para oligomerizar al necrosoma dentro de una estructura doblada y activar la cinasa RIPK3 (figura 15-39). Evidencias recientes sugieren que un sustrato de RIPK3, llamado MLKL, está dirigido a la membrana plasmática después de su fosforilación. Se considera que el MLKL puede oligomerizarse para formar poros transmembrana que provocan la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la muerte celular.

## Supervivencia de la señalización celular

Así como hay señales que se encargan de la autodestrucción de una célula, existen señales opuestas que mantienen la supervivencia celular. De hecho, la interacción de los receptores del TNF con el TNF a menudo transmite dos señales opuestas y distintas en el interior de la célula: una estimula la apoptosis y la otra

estimula la supervivencia celular. Como consecuencia, la mayoría de las células que poseen receptores de TNF no experimenta apoptosis cuando se tratan con el TNF. Este constituyó un hallazgo decepcionante porque originalmente se esperaba que el TNF se pudiera emplear como un agente para destruir las células tumorales. Generalmente, la supervivencia celular está mediada a través de la activación de un factor de transcripción clave denominado NF-κB, el cual activa la expresión de genes que codifican las proteínas para la supervivencia celular. Podría parecer que el destino de una célula depende de un preciso balance entre las señales que promueven la supervivencia, la apoptosis y la necroptosis.

**REPASO**

1. ¿Cuáles son algunas de las funciones de la apoptosis en la biología de vertebrados? Describa los pasos que ocurren entre *a*) el tiempo en el que una molécula de TNF se une a su receptor y la eventual muerte de la célula y *b*) el momento en que un miembro proapoptótico Bcl-2 se une a la membrana mitocondrial externa y la muerte de la célula.
2. ¿Cuál es el desempeño de la formación de complejos que contienen caspasa en el proceso de apoptosis?





# Preguntas analíticas

1. El tema de la señalización celular se colocó cerca del final del libro porque enlaza muchos temas diferentes en la biología celular. Ahora que ha leído el capítulo, ¿estaría de acuerdo o en desacuerdo con esta afirmación? Apoye sus conclusiones con un ejemplo.
2. Supongamos que la vía de señalización en la figura 15-3 condujera a la activación de un gen que inhibe una cinasa dependiente de ciclina responsable de mover una célula a la fase S del ciclo celular. ¿Cómo afectaría una mutación debilitante en la proteína cinasa 3 al crecimiento celular?
3. ¿Cuál sería el efecto sobre la función hepática de una mutación en un gen que codifica cAMP fosfodiesterasa; de una mutación en un gen que codifica un receptor de glucagón; de una mutación en una fosforilasa cinasa que codifica genes; de una mutación que alteró el sitio activo de la GTPasa de una subunidad $G_\alpha$? (Supongamos en todos los casos que la mutación causa una pérdida de la función del producto génico.)
4. El $Ca^{2+}$, el $IP_3$ y el cAMP han sido descritos como segundos mensajeros. ¿De qué manera sus mecanismos de acción son similares? ¿De qué forma son diferentes?
5. En la cascada de reacción ilustrada en la figura 15-22, ¿qué pasos conducen a la amplificación y cuáles no? (Véase **"Video tutorial cuantitativo"**.)
6. Suponga que la epinefrina y la norepinefrina podrían iniciar una respuesta similar en una célula blanco particular. ¿Cómo podría determinar si los dos compuestos actúan uniéndose al mismo receptor de superficie celular?
7. Uno de los experimentos clave para demostrar que las uniones gap (sección 7.12) permitieron el paso de moléculas pequeñas se produjo al evitar las células del músculo cardiaco (las cuales responden a la norepinefrina por contracción) para formar uniones gap con células de la granulosa ovárica (que responden a la FSH al someterse a varios cambios metabólicos). Posteriormente, los investigadores agregaron la FSH al cultivo celular mixto y observaron la contracción de las células musculares. ¿Cómo pueden estas células responder a la FSH, y qué le indica esto sobre la estructura y función de las uniones gap?
8. ¿Cómo esperaría un análogo de GTP que la célula no podría hidrolizar (un análogo no hidrolizable) para afectar los eventos de señalización, los cuales se desarrollan durante la estimulación de una célula hepática por el glucagón? ¿Cuál sería el efecto del mismo análogo en la señal de transducción de una célula epitelial después de la exposición al factor de crecimiento epidérmico (EGF)? ¿Cómo se compararía esto con los efectos de la toxina del cólera (p. 590) en estas mismas células?
9. Sospecha que la fosfatidilcolina podría estar funcionando como un precursor de un segundo mensajero, que desencadena la secreción de una hormona en un tipo de célula de cultivo endocrino que usted está estudiando. Además, sospecha que el segundo mensajero liberado por la membrana plasmática en respuesta a un estímulo es el fosfato de colina. ¿Qué tipo de experimento podría realizar para verificar su hipótesis?
10. En la figura 15-27 se muestran los cambios localizados en el $[Ca^{2+}]$ dentro del árbol dendrítico de una célula de Purkinje. Los iones de calcio son agentes pequeños y rápidamente difusibles. ¿Cómo es posible que una célula mantenga diferentes concentraciones de este ion libre en diferentes regiones de su citosol? ¿Qué sospecha que sucedería si inyectara un pequeño volumen de solución de cloruro de calcio en una región de una bolsa que había sido inyectada previamente con una sonda fluorescente?
11. Formule una hipótesis que pueda explicar cómo el contacto de la superficie superior de un óvulo con un espermatozoide fertilizante en un sitio causa una onda de liberación de $Ca^{2+}$, que se extiende a través del óvulo completo, como se muestra en la figura 15-29.
12. Debido a que la calmodulina activa muchos efectores diferentes (p. ej., las proteínas cinasas, las fosfodiesterasas, las proteínas transportadoras de calcio), la molécula de calmodulina debe tener muchos sitios de unión diferentes en su superficie. ¿Estaría de acuerdo con esta afirmación? ¿Por qué sí o por qué no?
13. La diabetes mellitus es una enfermedad que puede ser el resultado de una serie de diferentes defectos relacionados con la función de la insulina. Describa tres anormalidades moleculares diferentes en una célula hepática que podrían causar que diferentes pacientes exhiban un cuadro clínico similar, que incluya, por ejemplo, altas concentraciones de glucosa en la sangre y en la orina.
14. ¿Esperaría que la respuesta de una célula al EGF sea más sensible a la fluidez de la membrana plasmática que su respuesta a la insulina? ¿Por qué sí o por qué no?
15. ¿Esperaría que una mutación en Ras actúe de manera dominante o recesiva como causa de cáncer? ¿Por qué? (Una mutación dominante causa su efecto cuando sólo uno de los alelos homólogos está mutado, mientras que una mutación recesiva requiere que ambos alelos del gen sean mutados) (Véase **"Video tutorial cuantitativo"**).
16. Especule sobre un mecanismo por el cual la apoptosis podría desempeñar una función crucial en la lucha contra el desarrollo del cáncer, un tema discutido en el siguiente capítulo.
17. Usted está trabajando con un tipo de fibroblasto que normalmente responde al factor de crecimiento epidérmico (EGF), al aumentar su tasa de crecimiento y división, y a la epinefrina disminuyendo su tasa de crecimiento y división. Usted ha determinado que estas dos respuestas requieren la vía MAP cinasa, y que el EGF actúa por medio del RTK y epinefrina a través de un receptor acoplado a la proteína G. Supongamos que ha identificado una cepa mutante de estas células que aún puede responder al EGF, pero no es la epinefrina la que inhibe por más tiempo. Usted sospecha que la mutación afecta la conversación cruzada entre dos vías (que se muestra en la figura 15-35). ¿Qué componente de esta figura podría verse afectado por dicha mutación?

18. ¿De qué manera la onda de calcio que ocurre en la fertilización es similar a un impulso nervioso que viaja por una neurona?
19. Ahora que ha leído la sección sobre la percepción del gusto, ¿por qué cree que ha sido difícil encontrar venenos eficaces para las ratas?
20. Uno de los genes del virus de la viruela bovina codifica una proteína llamada CrmA que es un potente inhibidor de las caspasas. ¿Qué efecto esperaría de este inhibidor en una célula infectada? ¿Por qué es esto ventajoso para el virus infeccioso?
21. La mayoría de los RTK actúan de forma directa sobre los efectores corriente abajo, mientras que el RTK de insulina procede a través de una proteína de atraque intermedia, un sustrato receptor de insulina (IRS). ¿Existe alguna ventaja en la señalización que pueda derivarse del uso de estos productos intermedios de IRS?
22. Los investigadores han informado que 1) la mayoría de los efectos fisiológicos de la insulina en las células blanco pueden bloquearse mediante la incubación de células con wortmanina, un compuesto que inhibe de manera específica la enzima PI3K y 2) la causa de que las células sobreexpresen una forma constitutiva activa de PKB (es decir, una forma de la enzima que es activa de forma continua e independiente de las circunstancias) induce una respuesta en las células, la cual es prácticamente idéntica a la adición de insulina a estas células. Si se observa la figura 15-25, ¿tienen estas observaciones relación con lo que podría haber predicho? ¿Por qué sí o por qué no?
23. Los ratones con bloqueo génico que no pueden producir caspasa-9 mueren a causa de una serie de defectos, especialmente un cerebro muy agrandado. ¿Por qué estos ratones tienen este fenotipo? ¿Cómo esperaría usted que el fenotipo de un ratón con bloqueo génico citocromo *c* se comparase con el del ratón con bloqueo génico caspasa-9?
24. ¿Por qué supone que algunas personas encuentran que un compuesto llamado PROP tiene un sabor amargo, mientras que otros no informan esta percepción?
25. La inhibición de una proteína cinasa específica a menudo conduce a una fosforilación aumentada de muchas proteínas ¿Cómo explicaría esta observación?

# CAPÍTULO 16 Cáncer

## HENRIETTA LACKS Y LA CÉLULA HELA

Henrietta Lacks tenía sólo 31 años cuando murió de un agresivo cáncer de cuello uterino en 1951, pero dejó un legado notable y duradero. Mientras Lacks estaba bajo tratamiento en el hospital Johns Hopkins, se tomó una muestra de tejido de su cáncer y se entregó a un biólogo llamado George Gey. Lacks y su familia no fueron consultados porque, en ese momento, no se requería el consentimiento de un paciente antes de proporcionar su tejido para investigación médica.

Gey había trabajado durante décadas en el establecimiento de una línea celular humana que podría proporcionar información sobre el cáncer. Sólo un año antes de recibir la muestra de Lacks, Gey había establecido un centro para el cultivo de tejidos en Johns Hopkins que incluía dispositivos hechos a mano para cultivar y estudiar las células. Una máquina, llamada tambor de rodillos, hacía girar lentamente numerosos tubos de vidrio soplado a mano, mientras los mantenía a temperatura cálida. En cada tubo, Gey colocaba una muestra de tejido y la bañaba en un caldo nutritivo que había ideado para sostener las células. Sin embargo, en tubo tras tubo, los tejidos sobrevivirían y crecerían sólo de 20 a 50 generaciones antes de morir.

(*continúa*)

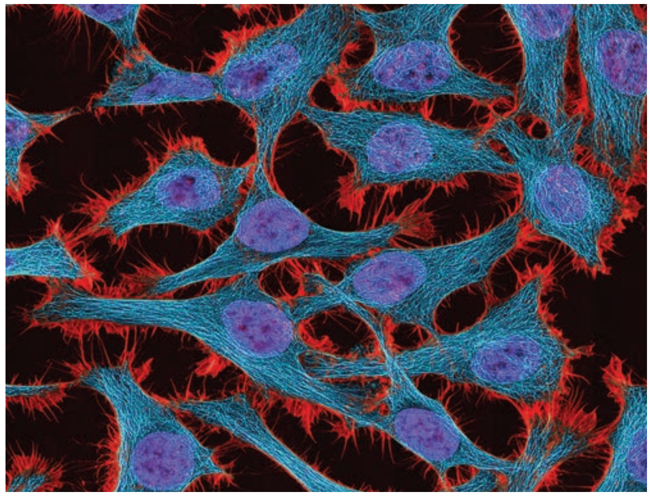


Imagen microscópica de células HeLa fijadas y teñidas contra actina (roja), microtúbulos (cian) y DNA (azul).
FUENTE: Cortesía de Tom Deerinck.

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**16.1** Propiedades básicas de una célula cancerosa
**16.2** Causas del cáncer
**16.3** **VÍAS EXPERIMENTALES:** Descubrimiento de los oncogenes
**16.4** Cáncer: un desorden genético
**16.5** Descripción de los genes supresores de tumores y oncogenes
**16.6** Genes supresores de tumores: el gen *RB*
**16.7** Genes supresores de tumores: el gen *TP53*
**16.8** Otros genes supresores de tumores
**16.9** Oncogenes
**16.10** Fenotipo mutador: genes mutantes involucrados en la reparación del DNA
**16.11** MicroRNA: un nuevo participante en la genética del cáncer
**16.12** El genoma del cáncer
**16.13** Análisis de la expresión génica
**16.14** Estrategias para combatir el cáncer
**16.15** Inmunoterapia
**16.16** Inhibición de la actividad de las proteínas promotoras del cáncer
**16.17** Concepto de una célula madre del cáncer
**16.18** Inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)

No obstante, en el tubo que contenía la muestra del tumor de Lacks, Gey observó algo que nunca antes había visto. Las células crecieron en abundancia, en una gruesa capa dentro del tubo. Gey dividió las células en tubos adicionales, donde continuaron dividiéndose y creciendo. No pasó mucho tiempo antes de que Gey se diera cuenta de que había creado la primera línea celular humana inmortal, a la que llamó HeLa a partir del nombre de la paciente de la cual se derivó.

Desde su creación en la década de 1950, las células HeLa se han utilizado para más de 74 000 estudios de investigación en todo el mundo. Sin embargo, el hecho de que nunca se haya otorgado permiso para el uso científico de las células de Lacks ha planteado numerosas cuestiones éticas difíciles que apenas se han comenzado a abordar recientemente. Por ejemplo, en 2013, la controversia rodeó el lanzamiento público del genoma HeLa recientemente secuenciado debido a las preocupaciones de privacidad de los descendientes de Lacks. Las discusiones entre los representantes de los Institutos Nacionales de Salud y la familia de Lacks llevaron a la creación de un grupo, que incluye a los miembros de la familia Lacks, que proporcionaría un acceso controlado a los datos genómicos.



## 16.1 Propiedades básicas de una célula cancerosa

El cáncer es una enfermedad genética porque se puede rastrear hasta alteraciones dentro de genes específicos, pero en la mayoría de los casos, no es una enfermedad hereditaria. En una enfermedad hereditaria, el defecto genético está presente en los cromosomas de un padre y se transmite al cigoto. En contraste, las alteraciones genéticas que conducen a la mayoría de los cánceres surgen en el DNA de una célula somática durante la vida del individuo afectado. Debido a estos cambios genéticos, las células cancerosas se liberan de muchas de las restricciones a las que están sometidas las células normales. Las células *normales* no se dividen a menos que sean estimuladas por la maquinaria homeostática del cuerpo; ni sobreviven si han sufrido daños irreparables; ni vagan lejos de un tejido para iniciar nuevas colonias en otras partes del cuerpo. Por el contrario, la mayoría de las células cancerosas experimenta una rotura de todas estas influencias regulatorias que protegen al cuerpo del caos y la autodestrucción. Lo más importante es que las células cancerosas proliferan incontrolablemente y producen tumores malignos que invaden el tejido sano circundante (véase **FIGURA 16-1**). Siempre que el crecimiento del tumor permanezca localizado, por lo general la enfermedad se puede tratar y curar mediante la extirpación quirúrgica del tumor. Pero los tumores malignos tienden a *hacer metástasis*, es decir, a generar células renegadas que se separan de la masa parental, ingresan a la circulación linfática o vascular y se diseminan a sitios distantes del cuerpo donde establecen tumores secundarios letales (*metástasis*) que ya no son susceptibles de eliminación quirúrgica. El tema de la metástasis se trata en “Perspectiva humana” del capítulo 7 (véase sección 17.8).

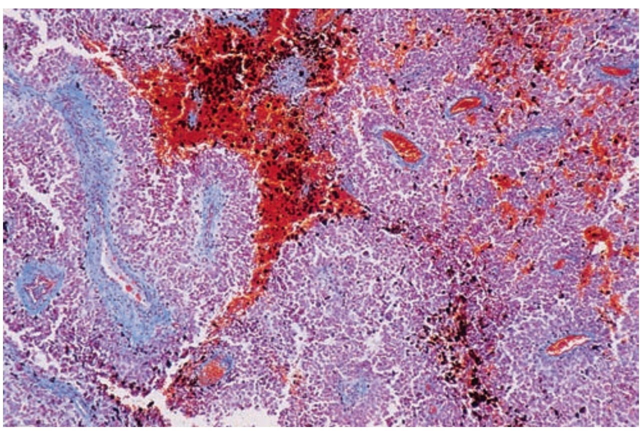


**FIGURA 16-1** Invasión de un tumor en crecimiento en tejido normal. Esta micrografía de luz de una sección del hígado humano muestra un melanosarcoma metastásico (en rojo) que está invadiendo el tejido hepático normal.

FUENTE: Astrid y Hanns-Frieder Michler/Photo Researchers, Inc.

Debido a su impacto en la salud humana y a la esperanza de que se pueda desarrollar una cura, el cáncer ha sido el centro de un esfuerzo de investigación masivo durante décadas. Aunque los estudios han llevado a un desarrollo notable en la comprensión de las bases celulares y moleculares del cáncer, los pronósticos para muchos tipos de cáncer permanecen relativamente sin cambios. Sin embargo, se ha avanzado. En 2011, la Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer informó que las tasas de mortalidad para todos los cánceres combinados disminuyeron durante los años comprendidos entre 1990 y 2007 en 22% para los hombres y 14% para las mujeres. Gran parte de este progreso se atribuye al diagnóstico y tratamiento más temprano de tres tipos principales de cáncer: cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de colon. La incidencia de varios tipos de cáncer en Estados Unidos y las tasas de mortalidad correspondientes se muestran en la **FIGURA 16-2**. La mayoría de los tratamientos actuales, como la quimioterapia y la radiación, carecen de la especificidad necesaria para destruir las células cancerosas sin dañar simultáneamente las células normales, como lo demuestran los graves efectos secundarios que acompañan a estos tratamientos. Como resultado, los pacientes suelen no poder someterse a dosis suficientemente altas de químicos o radiación para matar todas las células tumorales en su cuerpo. Los investigadores han estado trabajando durante muchos años para desarrollar terapias dirigidas más efectivas y menos debilitantes. Algunas de las más novedosas estrategias en la terapia contra el cáncer serán discutidas al final del capítulo.

El comportamiento de las células cancerosas es más fácil de estudiar cuando estas crecen en cultivo. Como se discutió al inicio del capítulo, las células cancerosas se pueden obtener mediante la eliminación de un tumor maligno, la disociación del tejido en sus células separadas, y el cultivo de las células *in vitro*. Con los años, muchas líneas diferentes de células cultivadas que originalmente se derivaron de tumores humanos se han recolectado en bancos de células y están disponibles para su estudio. Una alternativa es convertir las células normales en células cancerosas mediante tratamiento con sustancias químicas cancerígenas, radiación o virus tumorales. Las células que se han transformado *in vitro* por productos químicos o virus generalmente pueden causar tumores cuando se introducen en un animal hospedador adecuado. Existen muchas diferencias entre las propiedades de un tipo de célula cancerosa y las de otro tipo. Al mismo tiempo, hay una serie de propiedades básicas que comparten las células cancerosas, independientemente de su tejido de origen.

A nivel celular, la característica más importante de una célula cancerosa, ya sea que resida en el cuerpo o en un plato de cultivo, es su pérdida de control del crecimiento. La *capacidad* de crecimiento y división de una célula cancerosa no es muy diferente a la de la mayoría de las células normales. Cuando las células normales se desarrollan en cultivo en condiciones que promueven la proliferación celular, éstas crecen y se dividen a una velocidad similar a la de sus contrapartes malignas. Sin embargo, cuando proliferan hasta el punto en que cubren el fondo de la placa de

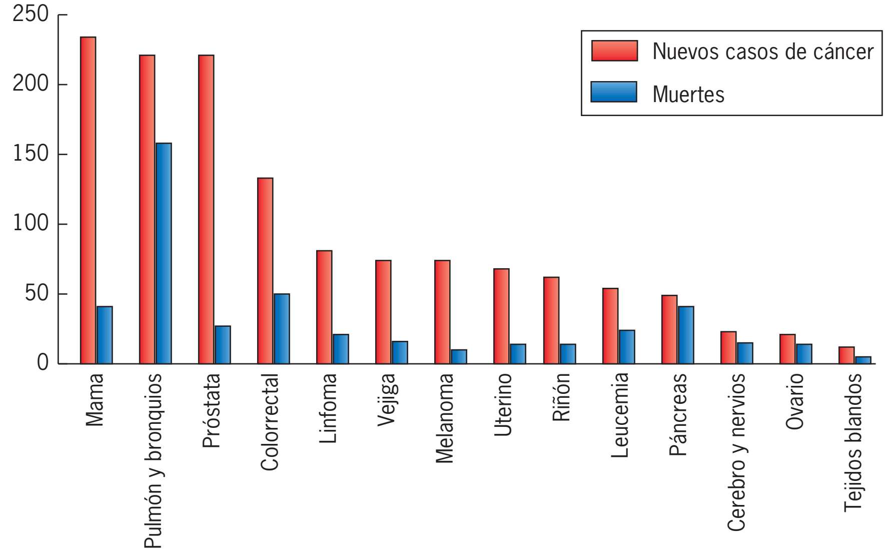



**FIGURA 16-2 Estimado de nuevos casos de cáncer y muertes en Estados Unidos en 2015.** Se estima un total de 1 658 370 nuevos casos de cáncer y 589 430 muertes por cáncer para 2015.

FUENTE: Datos de la American Cancer Society, Inc.

cultivo, su velocidad de crecimiento disminuye marcadamente, y tienden a permanecer como una sola capa (*monocapa*) de células (véase **FIGURA 16-3*a*, *b***). Las tasas de crecimiento disminuyen a medida que las células normales responden a las influencias inhibidoras de su ambiente. Las influencias inhibidoras del crecimiento pueden surgir como resultado del agotamiento de los factores de crecimiento en el medio de cultivo o del contacto con las células circundantes en la placa. Por el contrario, cuando las células malignas se cultivan en las mismas condiciones, continúan su crecimiento, se apilan una sobre otra para formar cúmulos (consúltese figura 16-3*c*, *d*). Es evidente que las células malignas no responden a los tipos de señales que hacen que sus homólogas normales dejen de crecer y dividirse.

Las células cancerosas no sólo ignoran las señales que inhiben el crecimiento, sino que prosiguen creciendo en ausencia de las señales estimulantes que requieren las células normales. Las células normales que crecen en cultivo dependen de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico y la insulina, que están presentes en el suero (la fracción líquida de la sangre), que generalmente se agrega al medio de cultivo (véase **FIGURA 16-4**). Las células cancerosas pueden proliferar en ausencia de suero porque su ciclo celular no depende de la interacción entre los factores de crecimiento y sus receptores, los cuales se localizan en la superficie celular (consúltese sección 15.10). Como veremos más adelante, esta transformación es el resultado de cambios básicos en las vías intracelulares que gobiernan la proliferación y la supervivencia celulares.

Las células normales que crecen en cultivo exhiben una capacidad limitada para la división celular; después de un número finito de divisiones mitóticas, éstas se someten a un proceso de envejecimiento que las vuelve inadecuadas para continuar su crecimiento y su división. Las células cancerosas, por otro lado, son aparentemente inmortales porque se dividen de manera indefinida.

Esta diferencia en el potencial de crecimiento a menudo se atribuye a la presencia de telomerasa en las células cancerosas y

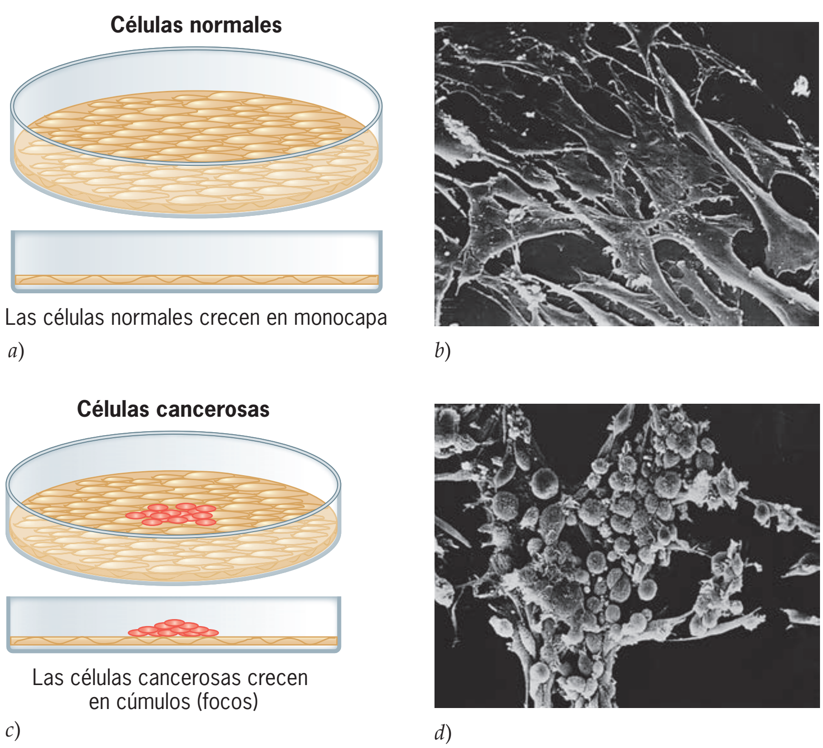



**FIGURA 16-3 Propiedades de crecimiento de las células normales y las cancerosas.** Generalmente las células normales crecen en una placa de cultivo hasta que cubren la superficie como una monocapa (*a* y *b*). Por el contrario, las células que han sido transformadas por virus o sustancias químicas cancerígenas (o células malignas que se han cultivado a partir de tumores) suelen crecer en cúmulos de múltiples capas o focos (*c* y *d*).

FUENTE: *b*, *d*) Cortesía de G Steven Martin, Universidad de California en Berkeley.

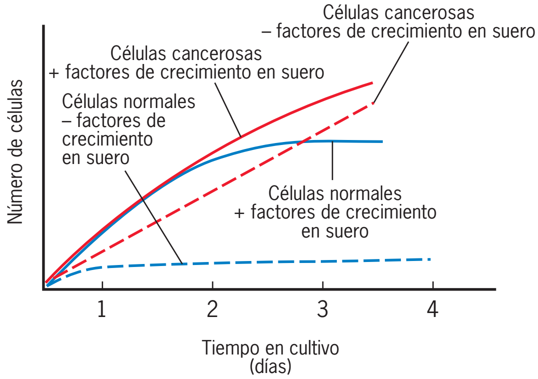



**FIGURA 16-4 Efectos de la privación de suero sobre el crecimiento de las células normales y transformadas.** Mientras que el crecimiento de las células cancerosas continúa independientemente de la presencia o ausencia de factores de crecimiento exógenos, las células normales requieren estas sustancias en su medio para que el crecimiento continúe. El crecimiento de las células normales se nivela a medida que se agotan los factores de crecimiento en el medio.

su ausencia en las normales. Recuérdese, de la página 475, que la telomerasa es la enzima que mantiene los telómeros en los extremos de los cromosomas, lo que permite que las células sigan dividiéndose. Se cree que la ausencia de telomerasa en la mayoría de los tipos de células normales es una de las principales defensas del organismo que protege contra el crecimiento tumoral.

Las alteraciones más llamativas en el núcleo después de la transformación ocurren dentro de los cromosomas. A diferencia de las células normales que replican su DNA a una tasa de error muy baja (p. 526), las células cancerosas son genéticamente inestables y a menudo tienen complementos cromosómicos altamente anómalos, una condición llamada *aneuploidía* (véase **FIGURA 16-5**), que puede ocurrir principalmente como resultado de defectos en el punto de control mitótico (véase sección 14.5) o la presencia de un número anormal de centrosomas (véase figura 14-17*c*).[1] En la figura 16-5 se aprecia que el crecimiento de las células cancerosas es mucho menos dependiente de un contenido cromosómico diploide estándar que el crecimiento de las células normales. De hecho, cuando el contenido cromosómico de una célula normal se altera, por lo regular se activa una vía de señalización que conduce a la autodestrucción (apoptosis) de la célula. Por el contrario, las células cancerosas por lo regular no logran inducir la apoptosis, incluso cuando el contenido se altera de forma notoria. La protección contra la apoptosis es otra característica importante que distingue a muchas células cancerosas de las células normales. Por último, se puede observar que las células cancerosas a menudo dependen de la glucólisis, considerada una vía metabólica anaeróbica (consúltese figura 3-24). Esta propiedad puede reflejar los altos requerimientos metabólicos de las células cancerosas y el inadecuado suministro de sangre dentro del tumor. Bajo condiciones de hipoxia ($O_2$ reducido), las células cancerosas activan un factor de transcripción llamado HIF que induce la formación de nuevos vasos sanguíneos y promueve las propiedades migratorias de las células, lo que puede contribuir a la diseminación del tumor. Sin embargo, aun cuando el oxígeno es abundante, muchas células tumorales continúan generando gran parte de su ATP por glucólisis (llamada glucólisis aeróbica). A pesar de que la glucólisis genera mucho menos ATP por glucosa que la fosforilación oxidativa en la mitocondria, produce ATP a un ritmo más rápido. El aumento de la captación de glucosa por parte de las células tumorales en comparación con las células normales se puede utilizar como un medio para localizar tumores metastásicos dentro del cuerpo usando las tomografías por emisión de positrones (PET) (véase figura 16-24).

[1] Existe controversia en cuanto a si el desarrollo de aneuploidía ocurre en una etapa temprana de la formación del tumor y es la causa de la inestabilidad genética que caracteriza a las células cancerosas, o es un evento tardío y es simplemente una consecuencia del crecimiento anormal del cáncer.

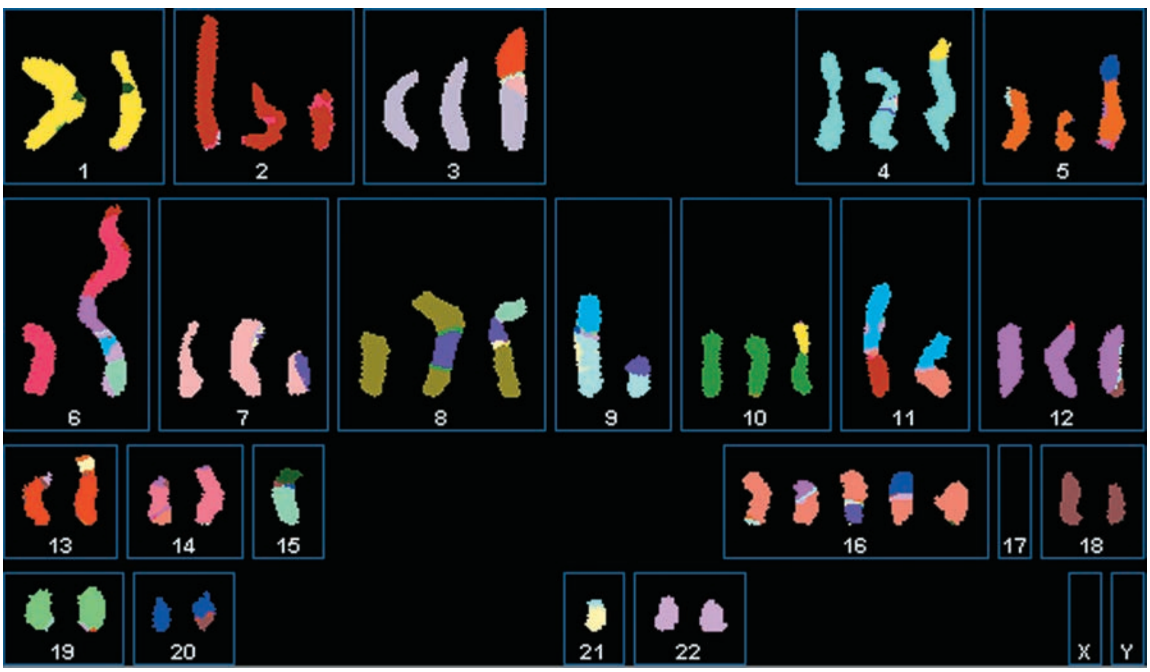



**FIGURA 16-5 Cariotipo de una célula de una línea de cáncer de mama que muestra un complemento cromosómico muy anormal.** Una célula diploide normal tendría 22 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. Los dos miembros de un par serían idénticos, y cada cromosoma tendría un único color continuo (como en el cariotipo de una célula normal en la figura 12-22*b* que utiliza una técnica de visualización espectral similar). Los cromosomas de esta célula están muy alterados, como lo demuestra la presencia de cromosomas adicionales y faltantes (es decir, aneuploidía), así como cromosomas de más de un color. Estos cromosomas multicolores reflejan la gran cantidad de translocaciones que se han producido en generaciones celulares anteriores. Una célula con puntos de control del ciclo celular normal y vías apoptóticas nunca alcanzaría un complemento cromosómico que se aproxime al que se ve aquí.

FUENTE: Cortesía de Joanne Davidson y Paul AW Edwards.

Son estas propiedades, que pueden demostrarse en cultivo, junto con su tendencia a diseminarse a sitios distantes dentro del cuerpo, las que hacen que las células cancerosas sean una amenaza para el bienestar de todo el organismo.

**REPASO**

1. Describa algunas de las propiedades que distinguen a las células cancerosas de las células normales.
2. ¿Cómo se manifiestan las propiedades de las células cancerosas en cultivo?

## 16.2 Causas del cáncer

En 1775, Percivall Pott, un cirujano británico, realizó la primera correlación conocida entre un agente ambiental y el desarrollo del cáncer. Pott concluyó que la alta incidencia de cáncer de la cavidad nasal y la piel del escroto en los deshollinadores se debía a su exposición crónica al hollín. En las últimas décadas, se aislaron los químicos cancerígenos del hollín, junto con cientos de otros compuestos que causan cáncer en animales de laboratorio. Además de una gran variedad de sustancias químicas, varios otros tipos de agentes también son cancerígenos, incluida la radiación ionizante y una variedad de virus que contienen DNA y RNA. Todos estos agentes tienen una propiedad en común: alteran el genoma. Casi siempre se puede demostrar que los productos químicos carcinógenos, como los que se encuentran en el hollín o el humo del cigarrillo, son directamente mutagénicos o que las enzimas celulares los convierten en compuestos mutagénos. Del mismo modo, la radiación ultravioleta, que es la principal causa de cáncer de piel, también es altamente mutagénica.

Varios virus pueden infectar células de mamíferos que crecen en cultivos celulares, transformándolos en células cancerosas. Estos virus se dividen de manera amplia en dos grandes grupos: **virus tumorales de DNA** y **virus tumorales de RNA**, según el tipo de ácido nucleico que se encuentre dentro de la partícula de virus maduro. Entre los virus de DNA capaces de transformar células están el virus del polioma, el virus del simio 40 (SV40), adenovirus y virus similares al del herpes. Los virus tumorales de RNA, o retrovirus, son similares en estructura al VIH (véase figura 1-22*b*) y son el tema del apartado "Vías experimentales" en la sección 16.3. Los virus tumorales pueden transformar las células porque portan genes cuyos productos interfieren con las actividades normales de regulación del crecimiento de la célula. Aunque los virus tumorales fueron una herramienta invaluable para los investigadores en la identificación de numerosos genes implicados en la transformación celular, están asociados con sólo un pequeño número de cánceres humanos. Sin embargo, otros tipos de virus están relacionados con hasta 20% de los cánceres en todo el mundo. En la mayoría de los casos, estos virus aumentan en gran medida el riesgo de una persona de desarrollar cáncer, en lugar de ser el único determinante responsable de la enfermedad. Esta relación entre la infección viral y el cáncer está ilustrada por el virus del papiloma humano (HPV, *human papilloma virus*), que puede transmitirse a través de la actividad sexual y está aumentando en frecuencia en la población. Aunque el virus está presente en cerca de 90% de los cánceres del cuello uterino, lo que indica su importancia en el desarrollo de la enfermedad, la gran mayoría de las mujeres que han sido infectadas con el virus nunca desarrollará esta malignidad. El HPV también está vinculado como principal agente causante de cáncer de boca y lengua tanto en hombres como en mujeres. Ya están disponibles las vacunas efectivas contra este virus. Otros virus vinculados a cánceres humanos incluyen el virus de la hepatitis B, que está asociado con el cáncer de hígado; el virus de Epstein-Barr, que se asocia al linfoma de Burkitt en áreas donde la malaria es común, y un virus del herpes (HHV-8), relacionado con el sarcoma de Kaposi.

Ciertos linfomas gástricos están asociados con la infección crónica de la bacteria *Helicobacter pylori*, que también puede causar úlceras. La evidencia reciente sugiere que muchos de estos cánceres vinculados a infecciones virales y bacterianas persistentes en realidad son causados por la inflamación crónica que se desencadena por la presencia del patógeno. Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, *inflammatory bowel disease*), que también se caracteriza por inflamación crónica, se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de colon. Estos hallazgos han llevado a los investigadores a observar más de cerca el proceso general de la inflamación como un factor no explorado anteriormente en el desarrollo de muchos tipos de cáncer.

La determinación de las causas de los diferentes tipos de cáncer es una tarea llevada a cabo por *epidemiólogos*, investigadores que estudian los patrones de las enfermedades en las poblaciones. Las causas de ciertos cánceres son obvias: fumar causa cáncer pulmonar, la exposición a la radiación ultravioleta causa cáncer de la piel y la inhalación de fibras de asbesto causa mesotelioma. Pero a pesar de una gran cantidad de estudios, aún no estamos seguros de las causas de la mayoría de los tipos de cáncer humano. Los seres humanos viven en ambientes complejos y están expuestos a muchos carcinógenos potenciales con un patrón cambiante durante décadas. Ha resultado muy difícil intentar determinar las causas del cáncer a partir de una montaña de datos estadísticos obtenidos de las respuestas a cuestionarios sobre estilos de vida individuales. La importancia de los factores ambientales (p. ej., la dieta) se advierte con más claridad en los estudios de los hijos de parejas que se han trasladado de Asia a Estados Unidos o Europa. Estas personas ya no exhiben una tasa alta de cáncer gástrico, como ocurre en Asia, sino que están sujetas a un riesgo elevado de cáncer de colon y de mama, que es característico de los países occidentales (consúltese **FIGURA 16-6**).

Existe un consenso general entre los epidemiólogos de que la dieta puede desempeñar un papel importante en el riesgo de desarrollar cáncer. Las tasas de cáncer son más altas entre las personas obesas que en las no obesas, y los estudios en primates sugieren que una dieta restringida en calorías (véase sección 3.14)

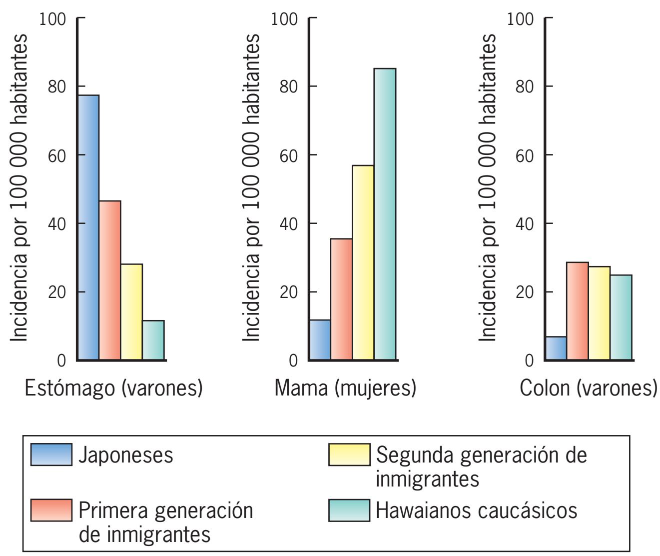



**FIGURA 16-6 Cambios en la incidencia del cáncer en personas de ascendencia japonesa después de la migración a Hawái.** La incidencia del cáncer estomacal disminuye, mientras que la de cáncer de mama y de colon aumenta. Sin embargo, de los tres tipos de cáncer, sólo el cáncer de colon ha alcanzado tasas equivalentes a las de los hawaianos caucásicos en la segunda generación.

FUENTE: Tomada de LN Kolonel, *et al*. Reimpreso con autorización de *Nature Revs Cancer* 2004;4:3; copyright 2004. *Nature Reviews Cancer* by Nature Publishing Group. Reproducido con la autorización de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

protege contra el cáncer. El centro de atención de las investigaciones más recientes ha residido en los niveles elevados de insulina y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que se encuentran en individuos obesos como la principal causa del aumento de la incidencia de cáncer en este grupo. Aunado a ello, hay evidencia de que algunos ingredientes de la dieta, como la grasa animal y el alcohol, pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer, mientras que ciertos compuestos que se encuentran en los alimentos pueden reducir ese riesgo. Como ejemplo de esta última afirmación se incluyen las isoflavonas que se encuentran en la soja, los sulforafanos que están en el brócoli y EGCG que se encuentran en el té. Varios medicamentos muy recetados también tienen un efecto preventivo. Los fármacos que interfieren con la acción del estrógeno (p. ej., tamoxifeno o raloxifeno) o en el metabolismo de la testosterona (p. ej., finasterida) pueden reducir la incidencia de cáncer de mama o cáncer de próstata, respectivamente. El uso a largo plazo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) como la aspirina y la indometacina ha demostrado que disminuye de manera sustancial el riesgo de cáncer de colon. Se cree que tienen este efecto al inhibir la ciclooxigenasa-2, una enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas similares a las hormonas, que promueven el crecimiento de pólipos intestinales. La acción supresora de cáncer de los NSAID respalda la idea de que la inflamación desempeña un papel importante en el desarrollo de varios cánceres. También las personas que tomaron el medicamento antidiabético metformina parecen tener menos riesgo de desarrollar este tipo de enfermedad. En este caso, el beneficio puede ser el resultado de la acción del medicamento para reducir los niveles circulantes de insulina y del IGF-1.

**REPASO**

1. Describa al menos tres agentes diferentes que se sabe que son cancerígenos.
2. Describa varios factores que pueden conducir a un mayor riesgo de cáncer.

# 16.3 VÍAS EXPERIMENTALES

## Descubrimiento de los oncogenes

En 1911, Peyton Rous del Instituto Rockefeller de Investigación Médica publicó un artículo de menos de una página (compartía la página con una nota sobre el tratamiento de la sífilis) y prácticamente no tuvo impacto en la comunidad científica. Sin embargo, este trabajo notificó una de las observaciones con más visión de futuro en el campo de la biología celular y molecular.[1] Rous trabajaba con un sarcoma de pollo que lograba propagarse de una gallina a otra mediante la inoculación al hospedador de la misma cepa con trozos de tejido tumoral. En este artículo, Rous describió una serie de experimentos que sugerían que el tumor podía transmitirse de un animal a otro por un "virus filtrable", un término acuñado una década antes para describir los agentes patógenos que eran lo bastante pequeños como para pasar a través de filtros que eran impermeables a las bacterias.

En sus experimentos, Rous eliminó los tumores de las pechugas de las gallinas, molió las células en un mortero con arena estéril, centrifugó las partículas hasta obtener un sedimento, eliminó el sobrenadante e impulsó el líquido sobrenadante a través de filtros de varias porosidades, incluido uno lo bastante pequeño como para evitar el paso de bacterias. Luego inyectó el filtrado en el músculo de la pechuga de una gallina receptora y descubrió que un porcentaje significativo de los animales inyectados desarrolló el tumor.

El virus descubierto por Rous en 1911 es un virus que contiene RNA. A finales de la década de 1960, se descubrió que virus similares estaban asociados con tumores mamarios y leucemias en roedores y gatos. Se han engendrado ciertas cepas de ratones que desarrollaron tumores específicos con muy alta frecuencia. Se pueden ver partículas virales que contienen RNA dentro de las células tumorales y también brotar de la superficie celular, como se muestra en la micrografía de la **FIGURA 1**. Era evidente que los genes que causan tumores en estas cepas endogámicas se transmiten de manera vertical, es decir, a través del óvulo fertilizado de la madre a la descendencia, de modo que invariablemente los adultos de cada generación desarrollan el tumor. Estos estudios proporcionaron evidencia de que el genoma viral puede heredarse a través de los gametos y posteriormente transmitirse de célula a célula por medio de la mitosis sin tener ningún efecto obvio sobre el comportamiento de las células. La presencia de genomas virales heredados no es una peculiaridad de las cepas endogámicas de laboratorio, porque se demostró que los ratones silvestres (salvajes) tratados con carcinógenos químicos desarrollan tumores que a menudo contienen los mismos antígenos característicos de los virus tumorales de RNA y que exhiben partículas de virus bajo el microscopio electrónico.

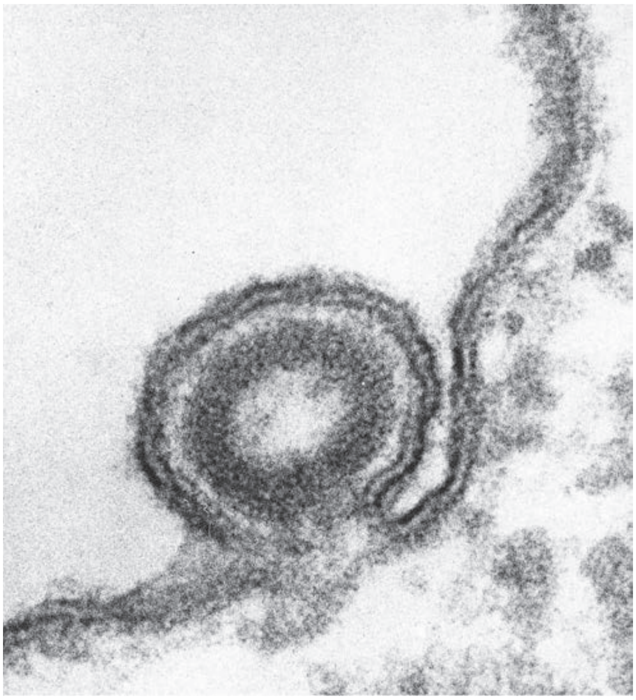


**FIGURA 1 Micrografía electrónica de un virus de leucemia de ratón Friend que brota de la superficie de una célula leucémica cultivada.**
FUENTE: Cortesía de E De Harven.

Una de las principales preguntas sobre la transmisión vertical de los virus tumorales de RNA era si el genoma viral se pasa de los progenitores a la progenie como moléculas de RNA libre o de alguna manera se integra en el DNA de la célula hospedadora. La evidencia indica que la infección y la transformación de estos virus requieren la síntesis de DNA. Howard Temin, de la Universidad de Wisconsin, sugirió que la replicación de los virus tumorales de RNA ocurre por medio de un intermediario de DNA, un provirus, que luego sirve como plantilla para la síntesis del RNA viral. Pero este modelo requiere una enzima única, una DNA

**TABLA 1 Caracterización del producto de polimerasa**

| Experimento | Tratamiento | Radiactividad insoluble en el ácido | Porcentaje de producto no digerido |
|---|---|---|---|
| 1 | No tratado | 1 425 | (100) |
| | 20 µg de desoxirribonucleasa | 125 | 9 |
| | 20 µg de nucleasa de micrococo | 69 | 5 |
| | 20 µg de ribonucleasa | 1 361 | 96 |
| 2 | No tratado | 1 644 | (100) |
| | Hidrolizado con NaOH | 1 684 | 100 |

*Fuente:* Tomado de D Baltimore, *Nature* 1970;226:1210, copyright 1970. *Nature* by Nature Publishing Group. Reproducido con autorización de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

polimerasa dependiente de RNA, que nunca se había encontrado en ningún tipo de célula. Luego, en 1970, David Baltimore, del Instituto de Tecnología de Massachusetts, y Temin y Satoshi Mizutani, descubrieron una enzima que posee esta actividad.[2,3]

Baltimore examinó los viriones (las partículas virales maduras) de dos virus tumorales de RNA, el virus de la leucemia de ratón Rauscher (R-MLV, *Rauscher mouse leukemia virus*) y el virus del sarcoma de Rous (RSV, *Rous sarcoma virus*). Se incubó una preparación de virus purificado en condiciones que promoverían la actividad de una polimerasa de DNA, que incluyó $Mg^{2+}$ (o $Mn^{2+}$), NaCl, ditiotreitol (que evita que los grupos —SH de la enzima se oxiden), y los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos, uno de los cuales (TTP) fue marcado radiactivamente. Bajo estas condiciones, la preparación incorporó el precursor marcado de DNA en un producto insoluble en ácido que exhibía las propiedades del DNA (consúltese tabla 1). Como es característico del DNA, el producto de reacción se volvió soluble en ácido (lo que indica que se había convertido en producto de bajo peso molecular) mediante tratamiento con desoxirribonucleasa pancreática o nucleasa de micrococos, pero no se vio afectado por la ribonucleasa pancreática o por hidrólisis alcalina (a la cual es sensible el RNA; véase tabla 1). Se encontró que la enzima de polimerización de RNA cosedimentaba junto a las partículas virales maduras, lo que sugiere que era parte del virión en sí y no una enzima donada por la célula hospedadora. Aunque el producto era insensible al tratamiento con ribonucleasa pancreática, la plantilla era muy sensible a esta enzima (obsérvese **FIGURA 2**), particularmente si los viriones se trataban previamente con la ribonucleasa antes de la adición de los otros componentes de la mezcla de reacción (véase figura 2, curva 4). Estos resultados reforzaron la sugerencia de que el RNA viral otorgaba la plantilla para la síntesis de una copia de DNA, que supuestamente servía como plantilla para la síntesis de los mRNA virales requeridos para la infección y la transformación. Estos experimentos no sólo sugirieron que la transformación celular por virus tumorales de RNA procedía de un intermediario de DNA, sino que también anularon el antiguo concepto originalmente propuesto por Francis Crick y conocido como el dogma central, que establecía que la información en una célula siempre fluye desde el DNA al RNA y a la proteína. La DNA polimerasa dependiente de RNA se conoce como transcriptasa inversa.

Durante la década de 1970, la atención se fijó en la identificación de los genes transportados por los virus tumorales que fueron responsables de la transformación y del mecanismo de acción de los productos génicos.

Las evidencias de los análisis genéticos indicaron que podían aislarse cepas mutantes de virus que conservaban la capacidad de crecer en las células hospedadoras, pero que no podían transformar la célula en una que exhibiera propiedades malignas.[4] Por tanto, la capacidad de transformar una célula residía en una porción restringida del genoma viral.

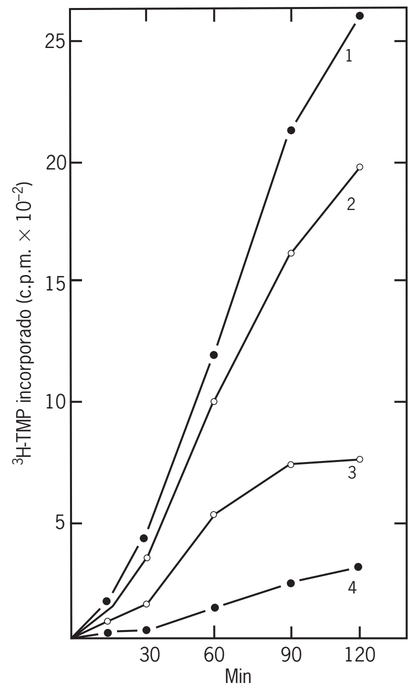



**FIGURA 2 Incorporación de radiactividad de [$^3$H]TTP en un precipitado insoluble en ácido por la ADN polimerasa del virus de la leucemia murina Rauscher en presencia y ausencia de ribonucleasa.** (*Nota:* el precursor de TTP marcado se convierte en TMP conforme se incorpora al DNA). Curva 1, sin ribonucleasa añadida; curva 2, preincubada sin ribonucleasa agregada durante 20 minutos antes de la adición de [$^3$H]TTP; curva 3, ribonucleasa añadida a la mezcla de reacción; curva 4, preincubada con ribonucleasa antes de la adición de [$^3$H]TTP.

FUENTE: Tomada de D Baltimore, *Nature* 1970;226:1210, copyright 1970. *Nature* by Nature Publishing Group. Reproducido con autorización de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

Estos hallazgos establecieron las bases para una serie de documentos de Harold Varmus, J Michael Bishop, Dominique Stehelin y sus colaboradores de la Universidad de California en San Francisco. Estos investigadores comenzaron aislando las cepas mutantes del virus del sarcoma aviar (ASV, *avian sarcoma virus*) que tenían deleciones de 10-20% del genoma que incapacita al virus para inducir sarcomas en pollos o para transformar fibroblastos en cultivos. El gen responsable de la transformación, que falta en estos mutantes, se denominó *src* (de sarcoma). Para aislar el DNA correspondiente a las regiones eliminadas de estos mutantes, que presumiblemente llevan los genes requeridos para la transformación, se adoptó la siguiente estrategia experimental.[5] El RNA de los genomas de viriones completos (oncogénicos) se usó como plantilla para la formación de un DNA complementario (cDNA, *complementary DNA*) monocatenario marcado radiactivamente, para lo cual se usó la transcriptasa inversa. El cDNA marcado (que está presente como fragmentos) se unió en un híbrido con el RNA obtenido a partir de uno de los mutantes de la deleción. Los fragmentos de DNA que no formaron híbridos con el RNA representan porciones del genoma que se habían eliminado del mutante incapaz de provocar la transformación y, por ello, se presume que contienen el gen requerido por el virus para causar la transformación. Los fragmentos de DNA que no formaron híbridos con el RNA se separaron de los que formaban parte de los híbridos DNA-RNA mediante cromatografía en columna. Al utilizar esta estrategia básica, se aisló una secuencia de DNA denominada $cDNA_{sarc}$, que correspondía a aproximadamente 16% del genoma vírico (1 600 nucleótidos de una longitud genómica total de 10 000 nucleótidos).

Una vez aislado, el $cDNA_{sarc}$ demostró ser una sonda muy útil. Primero se probó que este cDNA marcado forma híbridos

(*continúa*)

con el DNA extraído de células de una variedad de especies de aves (pollo, pavo, codorniz, pato y emú), lo que indica que los genomas celulares de estas aves contienen una secuencia de DNA estrechamente relacionada con *src*.[6]

Estos descubrimientos proporcionaron la primera evidencia sólida de que un gen transportado por un virus tumoral que causa la transformación celular está realmente presente en el DNA de las células normales (no infectadas) y, por tanto, es presumiblemente una parte del genoma normal de las células. Estos resultados indicaron que los genes transformadores del genoma viral (los oncogenes) no son verdaderos genes virales, sino genes celulares que fueron captados por virus tumorales de RNA durante una infección previa. La posesión de este gen derivado de la célula aparentemente dota al virus con el poder de transformar las mismas células en las que normalmente se encuentra el gen en cuestión. El hecho de que la secuencia esté presente en todas las especies de aves probadas sugiere que esta se ha conservado durante la evolución de las aves y, por ello, se supone que gobierna una actividad básica de las células normales. En un estudio posterior, se descubrió que el $cDNA_{sarc}$ se une al DNA de todas las clases de vertebrados, incluidos los mamíferos, pero no al DNA de erizos de mar, moscas de la fruta o bacterias. Con base en estos resultados, fue posible concluir que el gen ***src*** no sólo está presente en el RNA del genoma de ASV y el genoma de las células de pollo que puede infectar, sino que también está presente un gen homólogo en el DNA de vertebrados distantes, lo que sugiere que desempeña alguna función crítica en las células de todos los vertebrados.[7]

Estos hallazgos plantearon numerosas preguntas; las más importantes fueron 1) ¿cuál es la función del producto de gen ***src***? y 2) ¿cómo la presencia del gen viral (conocido como v-*src*) altera el comportamiento de una célula normal que ya posee una copia del gen celular (conocido como c-*src*)?

El producto del gen ***src*** fue identificado inicialmente por Ray Erikson y colaboradores en la Universidad de Colorado, mediante dos procedimientos independientes: 1) precipitación de la proteína a partir de extractos de células transformadas por anticuerpos preparados a partir de animales infectados con RSV, y 2) síntesis de la proteína en un sistema de síntesis de proteínas libre de células usando el gen viral aislado como plantilla. Al utilizar estos procedimientos, se descubrió que el producto del gen *src* es una proteína de 60 000 daltones, que denominaron $pp60^{src}$.[8] Cuando se incubó $pp60^{src}$ con $[^{32}P]ATP$, los grupos de fosfato radiactivo se transfirieron a las cadenas pesadas de las moléculas de anticuerpo asociadas (IgG) usadas en la inmunoprecipitación. Este hallazgo sugiere que el gen *src* codifica una enzima que posee actividad de proteína cinasa.[9] Cuando las células infectadas con ASV se fijaron, cortaron e incubaron con anticuerpos marcados con ferritina contra $pp60^{src}$, se encontró que los anticuerpos estaban localizados en la superficie interna de la membrana plasmática, lo que sugiere una concentración del producto del gen ***src*** en esta parte de la célula (consúltese **FIGURA 3**).[10]

Estos fueron los primeros estudios en dilucidar la función de un oncogén. La proteína cinasa es el tipo de producto genético del que podría esperarse que tuviera una actividad transformadora potencial, porque puede regular las actividades de muchas otras proteínas, cada una de las cuales puede cumplir una función crítica en una u otra actividad relacionada con el crecimiento celular. El análisis adicional del papel del producto del gen ***src*** resultó ser un hallazgo inesperado. A diferencia de todas las otras proteínas cinasas cuya función se había estudiado, $pp60^{src}$ transfirió grupos de fosfato a residuos de tirosina en la proteína sustrato en lugar de residuos de serina o treonina.[11] La existencia de residuos de tirosina fosforilada había escapado a la detección previa porque los residuos de serina y treonina fosforilados son aproximadamente 3 000 veces más abundantes en las células que la fosfotirosina, y porque los residuos de fosfotreonina y fosfotirosina son difíciles de separar el uno del otro por procedimientos electroforéticos tradicionales.

No sólo el producto del código del gen viral *src* (v-*src*) codifica una proteína tirosina cinasa, también lo hace c-*src*, la versión celular del gen. Sin embargo, el número de residuos de tirosina fosforilada en proteínas de células transformadas por RSV fue aproximadamente ocho veces mayor que en las células de control. Este hallazgo sugiere que la versión viral del gen puede inducir transformación porque funciona a un nivel más alto de actividad que la versión celular.

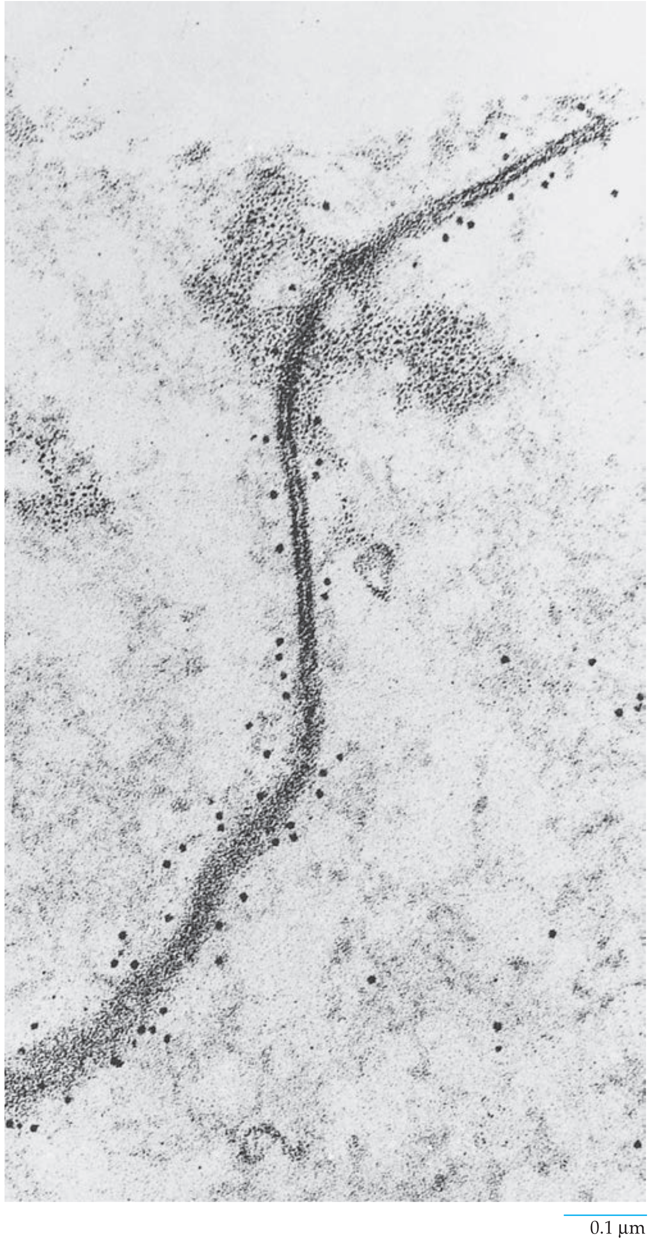



**FIGURA 3 Micrografía electrónica de un corte a través de un par de fibroblastos adyacentes que se habían tratado con anticuerpos marcados con ferritina contra la proteína $pp60^{src}$.** La proteína se localiza (según lo revelan los gránulos densos de ferritina) en la membrana plasmática de la célula y se concentra sobre todo en los sitios de uniones gap.

FUENTE: Tomada de Mark C Willingham, Gilbert Jay e Ira Pastan, *Cell* 1979;18:128, con autorización de Elsevier.

Los resultados del estudio de RSV proporcionaron evidencia preliminar de que una mayor actividad de un producto de oncogenes podría ser la clave para convertir una célula normal en una célula maligna. Pronto estuvo disponible la evidencia de que el fenotipo maligno también podría ser inducido por un oncogén que contuviera una secuencia de nucleótidos alterada. Robert Weinberg y sus colegas en el Instituto Tecnológico de Massachusetts realizaron un importante estudio inicial con la técnica de transfección de DNA.[12]

Weinberg comenzó los estudios mediante la obtención de 15 líneas celulares malignas distintas que se derivaron de células de ratón tratadas con un producto químico cancerígeno. Así, estas células se habían vuelto malignas sin exponerlas a virus. Se extrajo DNA de cada una de estas líneas celulares y se usó para transfectar un tipo de fibroblasto de ratón no maligno llamado célula NIH3T3. Las células NIH3T3 se seleccionaron para estos experimentos porque retoman el DNA exógeno con alta eficiencia y se transforman fácilmente en células malignas en cultivo. Después de la transfección con DNA de las células tumorales, los fibroblastos se cultivaron *in vitro*, y los cultivos se examinaron para determinar la formación de cúmulos (focos) que contuviesen células transformadas por el DNA agregado. De las 15 líneas celulares analizadas, cinco produjeron DNA que podría transformar las células receptoras NIH3T3. El DNA de las células normales carecía de esta capacidad. Estos resultados demostraron que los productos químicos cancerígenos causaron alteraciones en las secuencias de nucleótidos de los genes que dieron a los genes alterados la capacidad de transformar otras células. Por tanto, los genes celulares podrían convertirse en oncogenes de dos maneras distintas: como resultado de ser incorporados al genoma de un virus o por ser alterados con sustancias químicas cancerígenas.

Hasta este punto, prácticamente todos los estudios sobre genes causantes de cáncer se habían llevado a cabo en ratones, pollos u otros organismos cuyas células eran muy susceptibles a la transformación. En 1981, la atención se centró en el cáncer humano cuando se demostró que el DNA aislado de células tumorales humanas puede transformar células NIH3T3 de ratón después de la transfección.[13] De 26 tumores humanos diferentes que se analizaron en este estudio, dos proporcionaron DNA que fue capaz de transformar los fibroblastos de ratón. En ambos casos, el DNA se había extraído de líneas celulares tomadas de un carcinoma de vejiga (identificados como EJ y J82). Se realizaron grandes esfuerzos para determinar si los genes se habían derivado de un virus tumoral, pero no se detectó evidencia de DNA viral en estas células. Estos resultados proporcionaron la primera evidencia de que algunas células cancerosas humanas contienen un oncogén activado que puede transmitirse a otras células, lo que induce su transformación.

El hallazgo de que el cáncer puede transmitirse de una célula a otra por fragmentos de DNA proporcionó una base para determinar qué genes en una célula, cuando se activan por mutación u otro mecanismo, son responsables de que la célula se vuelva maligna. Para hacer esta determinación, fue necesario aislar el DNA que fue absorbido por las células y provocar su transformación. Una vez que se aisló el DNA ajeno responsable de la transformación, se pudo analizar la presencia de los alelos causantes de cáncer. Dos meses después, en 1982, tres laboratorios diferentes informaron sobre el aislamiento y la clonación de un gen no identificado a partir de células de carcinoma humano de vejiga que pueden transformar fibroblastos NIH3T3 de ratón.[14-16]

Una vez que el gen transformante de las células de cáncer vesical humano se había aislado y clonado, el siguiente paso era determinar si este gen tenía alguna relación con los oncogenes portados por los virus tumorales de RNA. Una vez más, con 2 meses de diferencia entre cada uno, se publicaron tres documentos de distintos laboratorios que informaron resultados similares.[17-19] Los tres mostraron que el oncogén de los carcinomas vesicales humanos que transforman las células NIH3T3 es el mismo oncogén (denominado *ras*) que porta el virus del sarcoma Harvey, que es un virus tumoral de RNA de rata. Las comparaciones preliminares de las dos versiones de *ras* —la versión viral y su homólogo celular— no mostraron ninguna diferencia, lo que indica que los dos genes son muy similares o idénticos. Estos hallazgos sugieren que los cánceres que se desarrollan espontáneamente en la población humana son causados por una alteración genética que es similar a los cambios en las células que se han transformado viralmente en el laboratorio. Es importante señalar que los tipos de cánceres inducidos por el virus del sarcoma de Harvey (sarcomas y eritroleucemias) son muy diferentes de los tumores vesicales, que tienen un origen epitelial. Esta fue la primera indicación de que las alteraciones en el mismo gen humano (*RAS*) pueden causar una amplia gama de tumores distintos.

A fines de 1982, tres documentos adicionales de diversos laboratorios informaron sobre los cambios precisos en el gen *RAS* humano que conduce a su activación como un oncogén.[20-22] Una vez que la sección de un gran fragmento de DNA que es responsable de causar la transformación se inmovilizó, el análisis de la secuencia de nucleótidos indicó que el DNA de las células vesicales malignas se activa como resultado de una única sustitución de bases dentro de la región codificadora del gen. Sorprendentemente, las células de ambos carcinomas vesicales humanos estudiados (identificados como EJ y T24) contienen precisamente DNA con la misma alteración: un nucleótido con guanina en un sitio específico en el DNA del protooncogén se había convertido en timidina en el oncogén activado. Esta sustitución de base da como resultado el reemplazo de una valina por una glicina como el decimosegundo resto de aminoácido del polipéptido.

La determinación de la secuencia de nucleótidos del gen v-*ras* portado por el virus del sarcoma de Harvey reveló una alteración en la secuencia de bases que afectaba precisamente al mismo codón que se había modificado en el DNA de los carcinomas vesicales humanos. El cambio en el gen viral sustituye a la glicina normal por una arginina. Parecía que este residuo particular de glicina jugaba un papel crítico en la estructura y función de esta proteína. Es interesante observar que el gen *RAS* humano es un protooncogén que, como *SRC*, se puede activar mediante un enlace a un promotor viral. De tal manera, *RAS* puede activarse para inducir la transformación mediante dos vías totalmente diferentes, bien por un aumento de su expresión o bien por una alteración de la secuencia de aminoácidos de su polipéptido codificado.

La investigación descrita en esta "Vías experimentales" representó un gran avance en nuestra comprensión de la base genética de la transformación maligna. Gran parte de la investigación inicial sobre los virus de tumores de RNA derivó de la creencia de que estos agentes pueden ser un importante agente causal en el desarrollo del cáncer humano. La búsqueda de virus como causa de cáncer llevó al descubrimiento del oncogén, lo cual condujo a la constatación de que el oncogén es una secuencia celular adquirida por el virus, lo que finalmente llevó al descubrimiento de que un oncogén puede causar cáncer sin la participación de un genoma viral. Por tanto, los virus tumorales, que no están directamente involucrados en la mayoría de los cánceres humanos, han proporcionado la ventana necesaria a través de la cual podemos ver nuestra propia herencia genética para la obtención de información que pueda conducir a nuestra propia ruina.

## Referencias


1. Rous P. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *J Am Med Assoc* 1911;56:198.
2. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970;226:1209-1211.
3. Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970;226:1211-1213.
4. Martin GS. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 1970;227:1021-1023.
5. Stehelin D, *et al*. Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J Mol Biol* 1976;101: 3 49-365.
6. Stehelin D, *et al*. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976;260:170-173.
7. Spector DH, Varmus HE, Bishop JM. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1978;75:4102-4106.


(*continúa*)

8. Purchio AF, *et al*. Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1978; 75:1567-1671.
9. Collett MS, Erikson RL. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1978;75:2021-2924.
10. Willingham MC, Jay G, & Pastan I. Localization of the ASV src gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 1979;18: 125-134.
11. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1980;77:1311-1315.
12. Shih C, *et al*. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1979;76:5714-5718.
13. Krontiris TG & Cooper GM. Transforming activity of human tumor DNA. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1981;78:1181-1184.
14. Goldfarb M, *et al*. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982;296:404-409.
15. Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 1982;29:161-169.
16. Pulciani S, *et al*. Oncogenes in human tumor cell lines: Molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1982;79:2845-2849.
17. Parada LF, *et al*. Human EJ bladder carcinoma oncogene is a homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 1982; 297:474-478.
18. Der CJ, *et al*. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1982;79:3637-3640.
19. Santos E, *et al.* T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 1982;298:343-347.
20. Tabin CJ, *et al*. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982;300:143-149.
21. Reddy EP, *et al*. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300:149-152.
22. Taparowsky E, *et al*. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982;300:762-765.

## 16.4 Cáncer: un desorden genético

El cáncer es una de las dos principales causas de muerte en los países occidentales, y afecta aproximadamente a una de cada tres personas. Visto de esta manera, el cáncer es una enfermedad muy frecuente. Pero a nivel celular, el desarrollo de un cáncer es un evento muy raro. Cada vez que se examinan genéticamente las células de un tumor canceroso, invariablemente se descubre que han surgido de una sola célula. Por tanto, a diferencia de otras enfermedades que requieren la modificación de un gran número de células, el cáncer es el resultado de la proliferación incontrolada de una única célula extraña (se dice que el cáncer es *monoclonal*). Considérese por un momento que el cuerpo humano contiene trillones de células, miles de millones de las cuales se someten a la división celular en un día cualquiera. Aunque casi todas estas células en división pueden tener el potencial de cambiar en la composición genética y convertirse en un tumor maligno, esto sólo ocurre en aproximadamente un tercio de la población humana durante toda su vida.

Una de las principales razones por las que un mayor número de células no da lugar a tumores cancerosos es que la transformación maligna requiere más que una sola alteración genética. Podemos distinguir dos tipos de alteraciones genéticas que pueden hacernos más propensos a desarrollar un tipo particular de cáncer: las que heredamos de nuestros padres (mutaciones en la línea germinal) y las que ocurren durante nuestra propia vida (mutaciones somáticas). Hay algunos tipos de mutaciones que podemos heredar que nos hacen mucho más propensos a desarrollar cáncer. El estudio de estas mutaciones nos ha enseñado mucho sobre cómo los genes que funcionan mal pueden conducir al desarrollo del cáncer; algunos de estos síndromes de cáncer hereditarios se analizarán más adelante en esta sección. Sin embargo, en gran parte, las mutaciones hereditarias no son un factor importante en la aparición de la mayoría de los casos de la enfermedad. Una forma de determinar una estimación global del impacto de la herencia en la formación de tumores es comprobar la probabilidad de que dos gemelos idénticos desarrollen el mismo tipo de cáncer cuando alcancen cierta edad. Este tipo de estudios sugiere que la probabilidad de que dos gemelos idénticos de 75 años compartan un cáncer en particular, como el cáncer de mama o de próstata, generalmente está entre 10 y 15%, en dependencia del tipo de cáncer. Claramente, los genes que heredamos tienen una influencia significativa en nuestros riesgos de desarrollar cáncer, pero el mayor impacto proviene de los genes que se alteran durante nuestra vida.

El desarrollo de un tumor maligno (*oncogénesis*) es un proceso de múltiples pasos caracterizado por una progresión de alteraciones genéticas permanentes en una sola línea de células, que puede ocurrir a lo largo de muchas divisiones celulares sucesivas y que toma décadas para completarse. Cada cambio genético puede provocar una característica particular del estado maligno, como la protección contra la apoptosis, como se discutió en la sección 16.1. A medida que estos cambios genéticos se producen gradualmente, las células de la línea responden cada vez menos a la maquinaria reguladora normal del cuerpo y pueden invadir mejor los tejidos normales. De acuerdo con este concepto, la oncogénesis requiere que la célula responsable de iniciar el cáncer sea capaz de un gran número de divisiones celulares. Este requerimiento ha hecho que se ponga mucha atención en los tipos de células que están presentes en un tejido que podría tener el potencial de convertirse en un tumor.

Los tumores sólidos más comunes, como los de mama, colon, próstata y pulmón, surgen en los tejidos epiteliales que de manera normal experimentan un nivel relativamente alto de división celular. Lo mismo es válido para las leucemias, que se desarrollan en tejidos formadores de sangre en rápida división. Las células de la mayoría de los tejidos se pueden dividir de manera aproximada en tres grupos: 1) las células madre, que poseen un potencial de proliferación ilimitado, tienen la capacidad de producir más células madre y pueden dar origen a todas las células del tejido (consúltese sección 1.6); 2) células progenitoras, que se derivan de células madre y poseen una capacidad limitada para proliferar, y 3) los productos finales diferenciados del tejido, que generalmente carecen de la capacidad de dividirse. En la figura 17-6 se ilustran ejemplos de estos tres grupos de células.

Dado el hecho de que la formación tumoral requiere que una célula sea capaz de dividirse extensamente, se han considerado dos escenarios generales para el origen de los tumores. Según un escenario, el cáncer surge dentro de la población relativamente pequeña de células madre que habitan en cada tejido adulto. Dada su larga vida y potencial de división ilimitado, las células madre tienen la oportunidad de acumular las mutaciones necesarias para la transformación maligna. Según otro escenario, las

células progenitoras pueden dar lugar a tumores malignos al adquirir ciertas propiedades, como la capacidad de proliferación ilimitada, como parte del proceso de progresión tumoral. Como se ilustra en la **FIGURA 16-7**, estos dos escenarios no son mutuamente excluyentes, ya que se cree que algunos tumores surgen de células madre y otros de la población de células progenitoras.

A medida que el cáncer crece, las células de la masa tumoral se someten a un tipo de selección natural que propicia la acumulación de células con las propiedades más favorables para el crecimiento tumoral. Por ejemplo, sólo aquellos tumores que contienen células que mantienen la longitud de sus telómeros serán capaces de crecer ilimitadamente (p. 473). Cualquier célula que aparezca dentro de un tumor que exprese la telomerasa tendrá una enorme ventaja de crecimiento sobre otras células que no expresan esta enzima. Con el tiempo, las células que expresan la telomerasa florecerán mientras que las células que no la expresan morirán hasta que todas las células del tumor contengan la telomerasa. La expresión de la telomerasa ilustra otra característica importante de la progresión tumoral: no todos estos cambios son resultado de la mutación genética. La activación de la expresión de la telomerasa puede considerarse un cambio epigenético, que se debe a la activación de un gen que está reprimido normalmente. Como se discutió en el capítulo 12, este tipo de proceso de activación probablemente involucre un cambio en la estructura de la cromatina en, y alrededor de, el gen y/o un cambio en el estado de la metilación del DNA. Una vez que ha ocurrido el cambio epigenético, se transmite a toda la progenie de esa célula y, en consecuencia, representa una alteración permanente y heredable. Incluso después de volverse malignas, las células cancerosas continúan acumulando mutaciones y cambios epigenéticos que las hacen cada vez más anormales (como se evidencia en la figura 16-5). Esta inestabilidad genética hace que la enfermedad sea difícil de tratar con la quimioterapia convencional porque las células que son resistentes al fármaco a menudo surgen dentro de la masa tumoral.

Los cambios genéticos que ocurren durante la progresión tumoral a menudo van acompañados de cambios histológicos, es decir, cambios en la apariencia de las células. Los cambios iniciales con frecuencia producen células que pueden identificarse como "precancerosas", lo que indica que han adquirido algunas de las propiedades de una célula cancerosa, como la pérdida de ciertos controles de crecimiento, pero carecen de la capacidad de invadir tejidos normales o hacer metástasis en sitios distantes. La prueba de Papanicolaou es un examen para detectar células precancerosas en el revestimiento epitelial del cuello uterino. El desarrollo de cáncer de cuello uterino generalmente progresa durante más de 10 años y se caracteriza por células cada vez más anormales (menos diferenciadas que las células normales, con núcleos más grandes, como en la **FIGURA 16-8**). Cuando se detec-

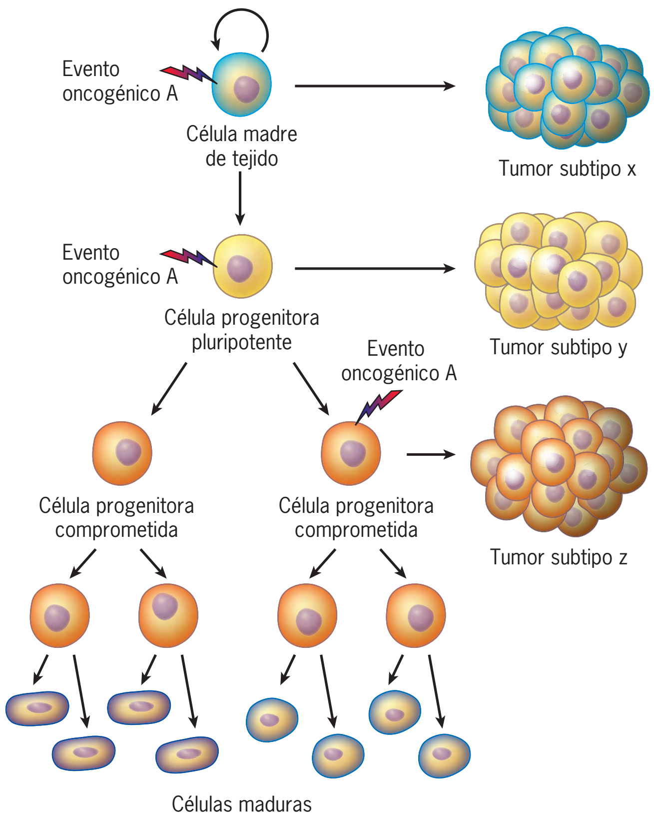
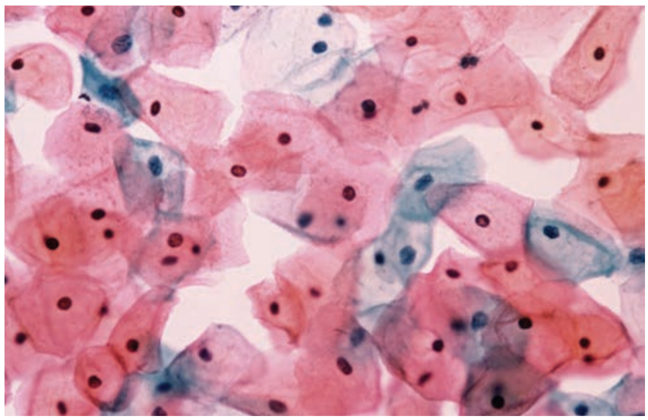
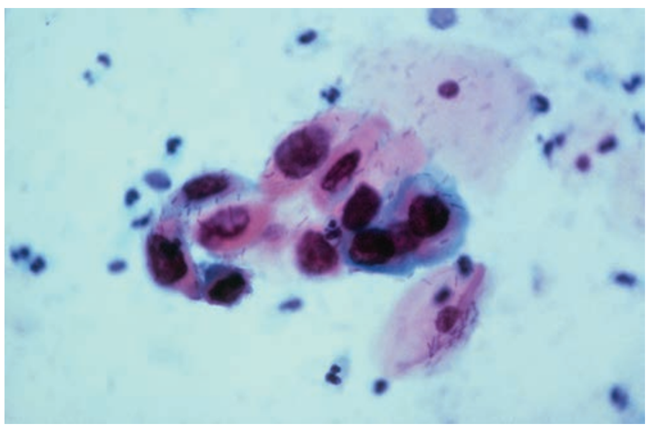



**FIGURA 16-7 Células que se proponen como origen de los tumores malignos.** Los tejidos contienen células en diversas etapas del compromiso y la diferenciación. Estas incluyen a las células madre, las células progenitoras multipotentes que pueden dar lugar a una variedad de tipos de células diferenciadas, las células progenitoras comprometidas que pueden dar lugar a un solo tipo de células diferenciadas, y las propias células diferenciadas (véase figura 17-6 para conocer los ejemplos). Según el modelo representado, los tumores pueden surgir de células madre de tejido o células progenitoras, aunque en algunos casos al menos, estas diferentes células de origen dan lugar a diferentes tipos de cáncer (indicado por los tres colores diferentes de los tumores).

FUENTE: JE Visvader, *Nature* 2011;469:316, figura 2b. *Nature* by Nature Publishing Group. Reproducido con el permiso de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.



*a*)



*b*)

**FIGURA 16-8 Detección de células anormales (premalignas) en una prueba de Papanicolaou.** *a*) Células epiteliales escamosas normales del cuello uterino. Las células tienen una morfología uniforme con un pequeño núcleo central. *b*) Células anormales de un caso de carcinoma *in situ*, que es un cáncer preinvasivo del cuello uterino. Las células tienen formas heterogéneas y núcleos grandes.

FUENTE: *a*) Dr. E Walker/Photo Researchers, Inc.; *b*) SPL/Photo Researchers, Inc.

tan células que tienen una apariencia anormal, se puede localizar la lesión precancerosa en el cuello uterino y destruirla mediante tratamiento con láser, congelación o cirugía. Algunos tejidos a menudo generan tumores *benignos*, que contienen células que han proliferado para formar una masa que representa una pequeña amenaza de convertirse en maligno. Los lunares que todos poseemos son un ejemplo de tumores benignos. Los estudios indican que las células pigmentarias que componen un lunar han sufrido una respuesta que les hace entrar en un estado permanente de detención del crecimiento, conocido como *senescencia*. Aparentemente, la senescencia se desencadena en estas células pigmentarias después de haber sufrido algunos de los cambios genéticos que, de otro modo, las harían convertirse en células malignas. Este proceso de "senescencia forzada" representa otra vía que se ha desarrollado para restringir el desarrollo de cánceres en organismos superiores. La base molecular de la senescencia se trata con más detalle en la sección 16.7.



**REPASO**

1. ¿Qué se entiende con la afirmación de que el cáncer surge como resultado de una progresión genética?

## 16.5 Descripción de los genes supresores de tumores y oncogenes

Los genes que han sido implicados en la carcinogénesis se dividen en dos grandes categorías: los genes supresores de tumores y los oncogenes. Los **genes supresores de tumores** actúan como frenos celulares; codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y evitan que las células se vuelvan malignas (consúltese **FIGURA 16-9*a***). Originalmente la existencia de estos genes salió a la luz a partir de estudios a finales de 1960 en los cuales las células normales y malignas de roedores se fusionaron entre sí. Algunas de las células híbridas que se formaron a partir de este tipo de fusión perdieron sus características malignas, lo que sugiere que una célula normal posee factores que pueden suprimir el crecimiento incontrolado de una célula cancerosa. Se recolectaron más datos de la existencia de genes supresores de tumores al observar que las regiones específicas de cromosomas particulares se eliminaban consistentemente en células de ciertos tipos de cáncer. Si la ausencia de tales genes se correlaciona con el desarrollo de un tumor, entonces se infiere que la presencia de estos genes normalmente suprime la formación del tumor.

Los **oncogenes**, por otro lado, codifican proteínas que promueven la pérdida del control del crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno (consúltese figura 16-9*b*). La mayoría de los oncogenes actúa como aceleradores de la proliferación celular, pero también tienen otras funciones. Los oncogenes pueden provocar inestabilidad genética, evitar que una célula se vuelva víctima de la apoptosis o promover la metástasis. La existencia de los oncogenes se descubrió a través de una serie de investigaciones sobre virus de tumores de RNA que está documentada en la sección "Vías experimentales". Estos virus transforman una célula normal en una célula maligna porque llevan un oncogén que codifica una proteína que interfiere con las actividades normales de la célula. El momento crucial en estos estudios se produjo en 1976, cuando se descubrió que un oncogén llamado *src*, portado por un virus tumoral de RNA llamado virus del sarcoma aviar, estaba realmente presente en el genoma de las células no infectadas. De hecho, el oncogén no era un gen viral, sino un gen celular que se había incorporado al genoma viral durante una infección previa. Pronto se hizo evidente que las células poseen una variedad de genes, ahora conocidos como **protooncogenes**, que tienen el potencial de subvertir las propias actividades de la célula y empujar a la célula hacia el estado maligno.

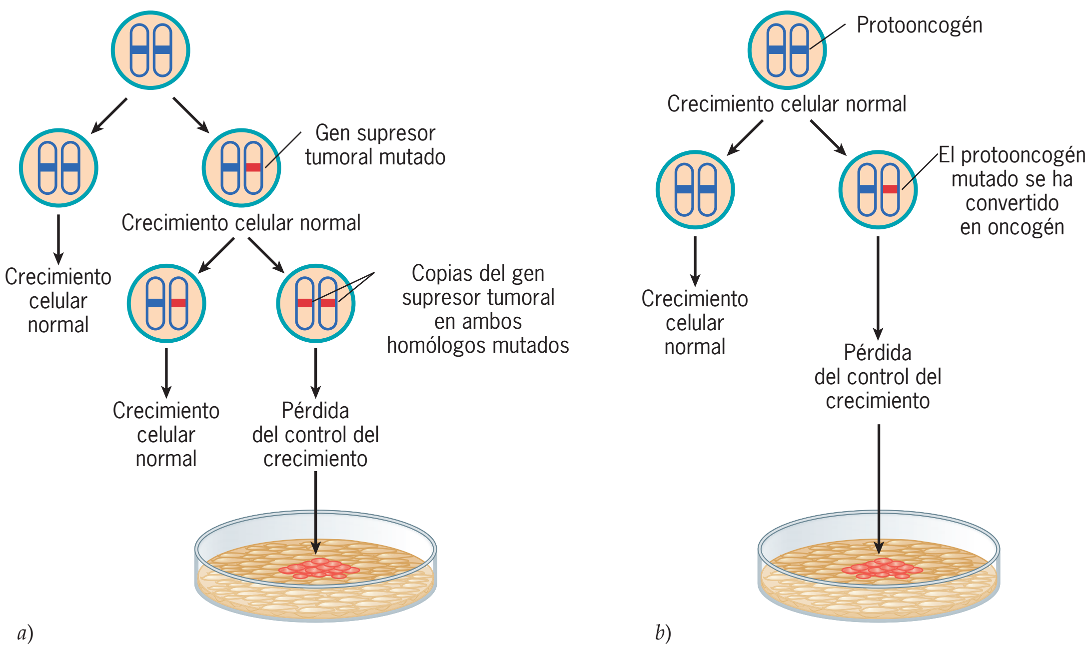



**FIGURA 16-9 Efectos contrastantes de mutaciones en genes supresores de tumores *a*) y oncogenes *b*).** Mientras que una mutación en una de las dos copias (alelos) de un oncogén puede ser suficiente para hacer que una célula pierda el control del crecimiento, ambas copias de un gen supresor tumoral deben ser eliminadas para inducir el mismo efecto. Como se discutirá en breve, los oncogenes surgen de los protooncogenes como efecto de mutaciones con ganancia de función, es decir, mutaciones que hacen que el producto génico presente nuevas funciones que conducen a la malignidad. Por el contrario, los genes supresores de tumores, sufren mutaciones con pérdida de función y/o desactivación epigenética que los vuelven incapaces de limitar el crecimiento celular.

Como se verá más adelante, los protooncogenes codifican proteínas que tienen diversas funciones en las actividades *normales* de una célula. Los protooncogenes se pueden convertir en oncogenes (es decir, *activarse*) por diferentes mecanismos (véase **FIGURA 16-10**):

1. El gen puede mutar de tal manera que altere las propiedades del producto del gen por lo que que ya no funcione de forma normal (véase figura 16-10, vía *a*).
2. El gen puede duplicarse una o más veces, lo que produce la amplificación génica y la producción excesiva de la proteína codificada (consúltese figura 16-10, vía *b*).
3. Se puede producir un nuevo ordenamiento cromosómico que mueva una secuencia de DNA de un sitio distante en el genoma hasta quedar próxima al gen, lo cual puede alterar la expresión del gen o la naturaleza del producto génico (consúltese figura 16-10, vía *c*).

Cualquiera de estas alteraciones genéticas puede hacer que una célula responda menos a los controles de crecimiento normales. Los oncogenes actúan de *manera dominante*, lo que significa que una sola copia de un oncogén puede hacer que la célula exprese el fenotipo alterado, independientemente de si hay una copia normal, no activada, del gen en el cromosoma homólogo (obsérvese figura 16-9*b*). Los investigadores han aprovechado esta propiedad para identificar oncogenes al introducir el DNA sospechoso de contener el gen en células cultivadas y monitorear las células en busca de evidencia de propiedades de crecimiento alteradas (véase sección 16.1).

Antes vimos que el desarrollo de un tumor maligno humano requiere más que una sola alteración genética. La razón se hace más aparente cuando se comprende que hay dos tipos de genes responsables de la formación de tumores. Siempre que una célula tenga su complemento completo de genes supresores de tumores, se cree que está protegida contra los efectos de un oncogén por razones que serán evidentes a continuación cuando se analicen las funciones de estos genes. La mayoría de los tumores contiene alteraciones tanto en los genes supresores de tumores como en los oncogenes, lo que sugiere que la pérdida de una función supresora de tumores dentro de una célula debe ir acompañada de la conversión de un protooncogén en un oncogén antes de que la célula se torne maligna. Incluso en ese caso, la célula puede no exhibir todas las propiedades requeridas para invadir los tejidos circundantes o formar colonias secundarias por metástasis. Se precisan mutaciones en genes adicionales, como las que codifican moléculas de adhesión celular o proteasas extracelulares (discutidas en la sección 7.8), antes de que estas células adquieran un fenotipo metastásico.

Ahora podemos pasar a las funciones de los productos codificados por genes supresores de tumores y oncogenes y examinar cómo las mutaciones en estos genes pueden provocar que una célula se vuelva maligna.

## REPASO

1. Compare un tumor benigno y un tumor maligno; genes supresores de tumores y oncogenes; mutaciones que actúan de forma dominante y recesiva; protooncogenes y oncogenes.

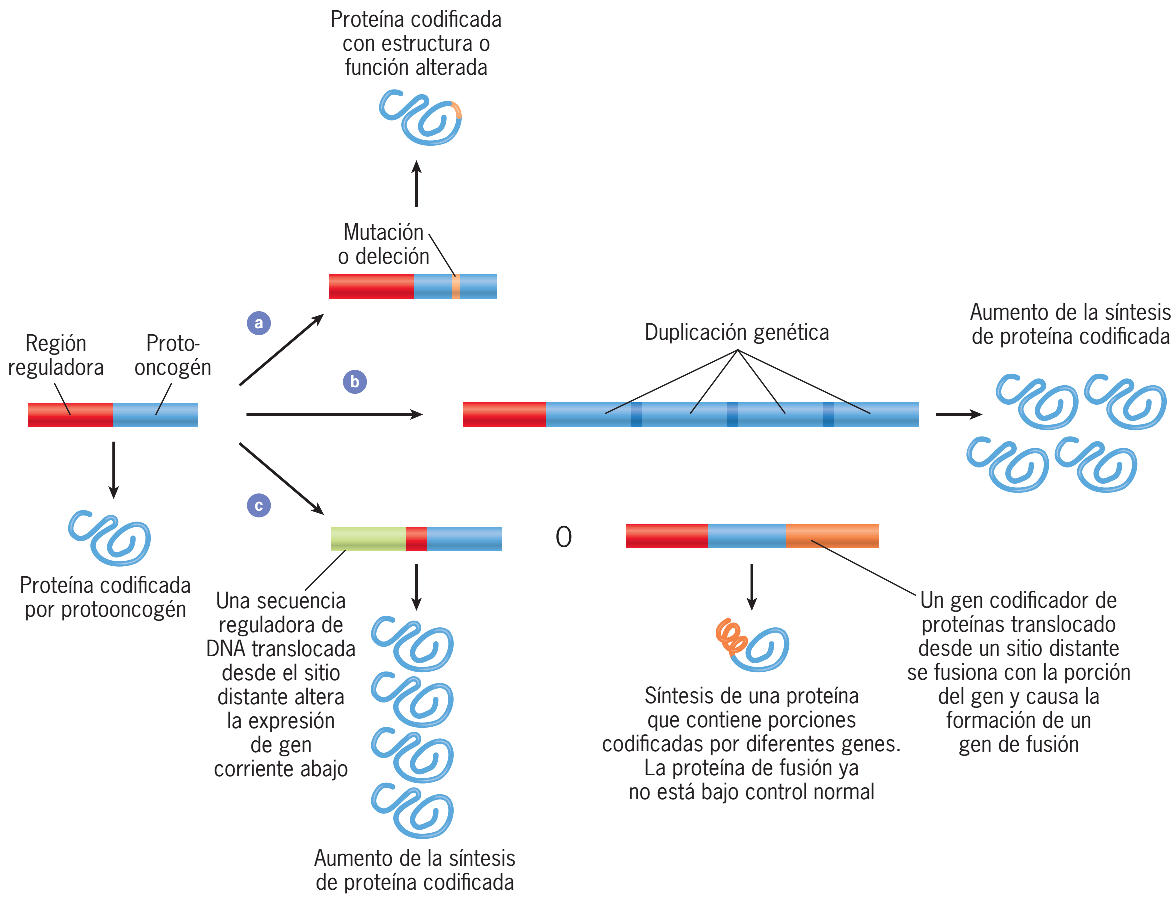



**FIGURA 16-10 Activación de un protooncogén a un oncogén.** La activación se puede lograr de varias maneras como se indica en esta figura. En la vía a, una mutación en el gen altera la estructura y la función de la proteína codificada. En la vía b, la amplificación génica da como resultado la sobreexpresión del gen. En la vía c, un reordenamiento del DNA coloca un nuevo segmento de DNA cerca o junto al gen, lo que altera su expresión o la estructura de la proteína codificada.

## 16.6 Genes supresores de tumores: el gen *RB*

La transformación de una célula normal en una célula cancerosa se acompaña de la pérdida de función de uno o más genes supresores de tumores. Los estudios de secuenciación de alto rendimiento han identificado cientos de genes que están implicados como supresores de tumores en humanos. Algunos de los genes mejor caracterizados, enumerados en la tabla 16-1, incluyen a los que codifican factores de transcripción (p. ej., *TP53* y *WT1*), reguladores del ciclo celular (p. ej., *RB* e *INK4a*), componentes que regulan las proteínas G (*NF1*), una fosfatasa de fosfoinosítido (*PTEN*) y una proteína que regula la degradación proteica (*VHL*).[2] De una u otra manera, la mayoría de las proteínas codificadas por genes supresores de tumores actúan como reguladores negativos de la proliferación celular, por lo que su eliminación promueve el crecimiento celular incontrolado. Los productos de genes supresores de tumores también ayudan a mantener la estabilidad genética, lo cual puede ser una razón primordial por la que los tumores contienen un cariotipo tan anormal (véase figura 16-5). Algunos genes supresores de tumores están involucrados en el desarrollo de una amplia variedad de distintos tipos de cáncer, mientras que otros juegan un papel en la formación de uno o pocos tipos de cáncer.

Es de común conocimiento que los miembros de algunas familias corren un alto riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer. Aunque estos síndromes de cáncer hereditario son raros, brindan la oportunidad de identificar genes supresores de tumores que, en su ausencia, contribuyen al desarrollo de formas hereditarias y esporádicas (es decir, no hereditarias) de cáncer. El primer gen supresor tumoral estudiado y finalmente clonado, y uno de los más importantes, se asocia con un raro cáncer infantil de la retina del ojo, llamado *retinoblastoma*. El gen responsable de este trastorno se llama *RB*. La incidencia de retinoblastoma sigue dos patrones distintos: 1) ocurre con gran frecuencia y a una edad temprana en los miembros de ciertas familias, y 2) ocurre esporádicamente a una edad más avanzada entre los miembros de la población en general. El hecho de que el retinoblastoma se presente en ciertas familias sugiere que el cáncer puede heredarse. El examen de células de niños que padecen retinoblastoma reveló que a un miembro del decimotercer par de cromosomas homólogos le faltaba una pequeña parte de la porción interior del cromosoma. La deleción estaba presente en todas las células de los niños, tanto las células del cáncer de retina como las células en otras partes del cuerpo, lo que indica que la alteración cromosómica se heredó de alguno de los padres.

[2] Para el presente capítulo, que trata principalmente de la biología humana, seguiremos una convención que se usa comúnmente: los genes humanos están escritos en letras mayúsculas (p. ej., *APC*), los genes de ratón están escritos con la primera letra en mayúscula (p. ej., *Brca1*), y los genes virales se escriben en minúsculas (p. ej., *src*).

El retinoblastoma se hereda como un rasgo genético dominante porque los miembros de familias de alto riesgo que desarrollan la enfermedad heredan un alelo normal y un alelo anormal. Pero a diferencia de la mayoría de las afecciones de herencia dominante, como la enfermedad de Huntington, donde un individuo que hereda un gen faltante o alterado invariablemente desarrolla el trastorno, los niños que heredan un cromosoma al que le falta el gen del retinoblastoma tienen una marcada disposición hacia el desarrollo del retinoblastoma. De hecho, aproximadamente 10% de las personas que heredan un cromosoma con una reducción de *RB* nunca desarrollan el cáncer de retina. ¿Cómo es que un pequeño porcentaje de estas personas predispuestas escapa de la enfermedad?

En 1971, Alfred Knudson, de la Universidad de Texas, explicó la base genética del retinoblastoma. Knudson propuso que el desarrollo del retinoblastoma requiere que ambas copias del gen *RB* de una célula retiniana se eliminen o muten antes de que la célula pueda dar lugar a un retinoblastoma. En otras palabras, el cáncer surge como resultado de dos "golpes" independientes en una sola célula. En los casos de retinoblastoma esporádico, el tumor se desarrolla a partir de una célula de la retina en la que ambas copias del gen *RB* han sufrido una mutación espontánea sucesiva (consúltese **FIGURA 16-11*a***). Debido a que es muy baja la posibilidad de que ambos alelos del mismo gen sean el blanco de mutaciones debilitantes en la misma célula, la incidencia del cáncer en la población general es bajísima. Por el contrario, las células de una persona que hereda un cromosoma con una deleción *RB* ya se encuentra a la mitad del camino para volverse maligno. La mutación o deleción del alelo *RB* restante en cualquiera de las células de la retina produce una célula que carece de un gen *RB* normal y, por ello, no puede producir un producto funcional del gen *RB* (véase figura 16-11*b*). Esto explica por qué las personas que heredan un gen *RB* anormal están tan predispuestas a desarrollar el cáncer. El segundo "golpe" no ocurre en aproximadamente 10% de estas personas, y no desarrollan la anomalía. La hipótesis de Knudson se confirmó con posterioridad, al examinar células de pacientes con una disposición hereditaria al retinoblastoma y encontrar que, como se predijo, ambos alelos del gen faltaban o estaban mutados en las células cancerosas. Los individuos con retinoblastomas esporádicos tenían células normales que carecían de mutaciones *RB* y células tumorales en las que ambos alelos del gen eran anormales.

Aunque las deficiencias en el gen *RB* se manifiestan por primera vez en el desarrollo de cánceres de retina, este no es el final de la historia. Las personas que padecen la forma hereditaria de retinoblastoma también tienen un alto riesgo de desarrollar otros tipos de tumores en edades avanzadas, en particular sarcomas de tejidos blandos (tumores de origen mesenquimatoso en lugar de epitelial). Las consecuencias de las mutaciones *RB* no se limitan a las personas que heredan un alelo mutante. Las mutaciones en los alelos *RB* son un fenómeno frecuente en los tipos esporá-

**TABLA 16-1 Genes supresores de tumores**

| Gen | Tumor primario | Función propuesta | Síndrome hereditario |
|---|---|---|---|
| *APC* | Colorrectal | Se une a la β-catenina como factor de transcripción | Poliposis adenomatosa familiar |
| *BRCA1* | Mamario | Reparación del DNA | Cáncer de mama familiar |
| *MSH2, MLH1* | Colorrectal | Reparación de discrepancia | HNPCC |
| *E-cadherina* | Mamario, colónico, etcétera | Molécula de adhesión celular | Cáncer gástrico familiar |
| *INK4a* | Melanoma, pancreático | Inhibidor de p16: Cdk<br>ARF: estabiliza p53 | Melanoma familiar |
| *NF1* | Neurofibromas | Activa GTPasa de Ras | Neurofibromatosis tipo 1 |
| *NF2* | Meningiomas | Vincula la membrana con el citoesqueleto | Neurofibromatosis tipo 2 |
| *TP53* | Sarcomas, linfomas, etcétera | Factor de transcripción (ciclo celular y apoptosis) | Síndrome de Li-Fraumeni |
| *PTEN* | Mamario, tiroideo | Fosfatasa $PIP_3$ | Enfermedad de Cowden |
| *RB* | Retinario | Se une a E2F (regulación de la transcripción en el ciclo celular) | Retinoblastoma |
| *VHL* | Renal | Elongación y degradación proteicas | Síndrome de Von Hippel-Lindau |
| *WT1* | Tumor de Wilms renal | Factor de transcripción | Tumor de Wilms |

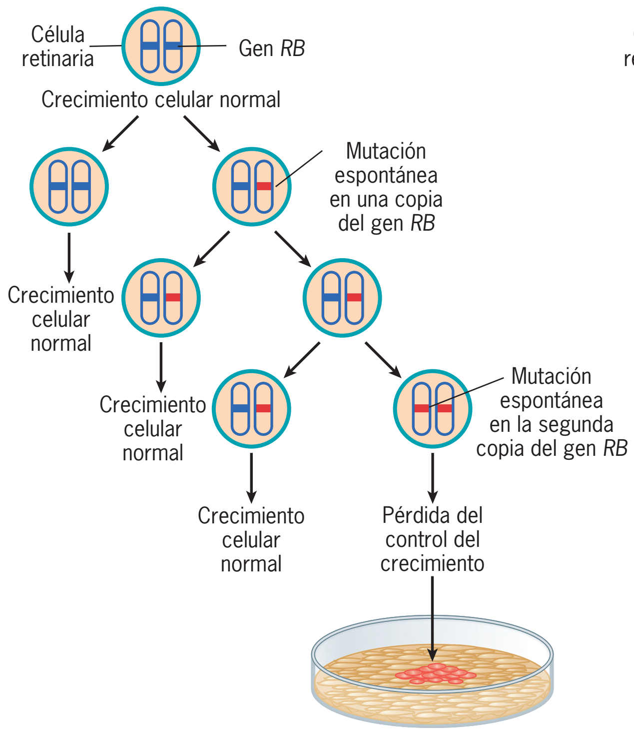



**FIGURA 16-11 Mutaciones en el gen RB que pueden conducir a retinoblastoma.** *a*) En casos esporádicos (es decir, no familiares) de la enfermedad, un individuo comienza su vida con dos copias normales del gen *RB* en el cigoto, y el retinoblastoma ocurre sólo en aquellos raros individuos en los que una célula retinal determinada acumula mutaciones independientes en ambos alelos del gen. *b*) En casos familiares (es decir, hereditarios) de la enfermedad, un individuo comienza la vida con un alelo anormal del gen *RB*, generalmente presente como una deleción. Por tanto, todas las células de la retina tienen al menos uno de sus dos genes *RB* sin función. Si el otro alelo *RB* en una célula de la retina se desactiva, generalmente como resultado de una mutación puntual, esa célula da lugar a un tumor de retina.

dicos de cáncer de mama, próstata y pulmón entre individuos que heredaron dos alelos *RB* normales.

Cuando las células de estos tumores se cultivan *in vitro*, la reintroducción de un gen *RB* de tipo nativo en las células es generalmente suficiente para suprimir su fenotipo canceroso, lo que indica que la pérdida de esta función del gen contribuye significativamente a la tumorogénesis. Miremos más detalladamente el papel del gen *RB*.

La importancia del ciclo celular en el crecimiento y la proliferación de las células se discutió en los capítulos 14 y 15, donde se observó que los factores que controlan el ciclo celular pueden desempeñar un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. En su función mejor estudiada, la proteína codificada por el gen *RB*, pRB, ayuda a regular la transición de las células de la etapa $G_1$ del ciclo celular a la fase S, durante la cual se produce la síntesis de DNA. Como se discutió en la sección 14.4, la transición de $G_1$ a S es un periodo de compromiso para la célula; una vez que una célula entra en la fase S, invariablemente continúa con el resto del ciclo celular hasta la mitosis. La transición de $G_1$ a S se acompaña de la activación de muchos genes diferentes que codifican proteínas que van desde polimerasas de DNA hasta ciclinas e histonas. Entre los factores de transcripción implicados en la activación de los genes necesarios para las actividades de la fase S figuran los miembros de la familia E2F de los factores de transcripción, que son objetivos clave de pRB. En la **FIGURA 16-12** se ilustra un modelo que representa el papel de pRB en el control de la actividad de E2F. Durante $G_1$, las proteínas E2F normalmente se unen a pRB, lo que impide que las moléculas E2F activen varios genes que codifican las proteínas requeridas para actividades de la fase S (p. ej., ciclina E y DNA polimerasa α). Los estudios demostraron (como se indica en el paso 1 de la figura 16-12) que el complejo E2F-pRB está asociado con DNA, pero actúa como un represor génico en lugar de un activador. A medida que se acerca el final de la etapa $G_1$, las cinasas dependientes de ciclina que regulan la transición de $G_1$-S fosforilan la subunidad pRB del complejo pRB-E2F. Una vez fosforilada, pRB libera su E2F unido, lo cual permite que el factor de transcripción active la expresión génica, lo que marca el compromiso irreversible de la célula de ingresar a la fase S. Se esperaría que una célula que pierde la actividad de pRB como resultado de una mutación en *RB* pierda su capacidad para desactivar E2F, lo que eliminaría ciertas restricciones sobre la entrada a la fase S. E2F es sólo una de las docenas de proteínas capaces de unirse a pRB, lo cual sugiere que la pRB tiene muchas funciones más. Otro hecho que indica la complejidad de las interacciones de pRb es que la proteína contiene al menos 16 residuos diferentes de serina y treonina que las cinasas dependientes de ciclina pueden fosforilar. Es probable que la fosforilación de diferentes combinaciones de residuos de aminoácidos permita que la proteína interactúe con diferentes blancos corriente abajo.

La importancia de la pRB como un regulador negativo del ciclo celular se demuestra por el hecho de que los virus tumorales de DNA (incluidos adenovirus, virus del papiloma humano y SV40) codifican una proteína que se une a la pRB y bloquean su capacidad para unirse a E2F. La capacidad de estos virus para inducir cáncer en las células infectadas depende de su potencial para bloquear la influencia negativa que tiene la pRB sobre la progresión de una célula a lo largo del ciclo celular. Al usar estas proteínas bloqueadoras de pRB, estos virus logran el mismo resultado que cuando se elimina el gen *RB*, lo que conduce al desarrollo de tumores.

## REPASO

1. Describa cómo se desarrolla el retinoblastoma en un individuo que ha heredado un cromosoma con una deleción de *RB*.
2. ¿Cuál es el papel habitual del gen *RB* en la célula?

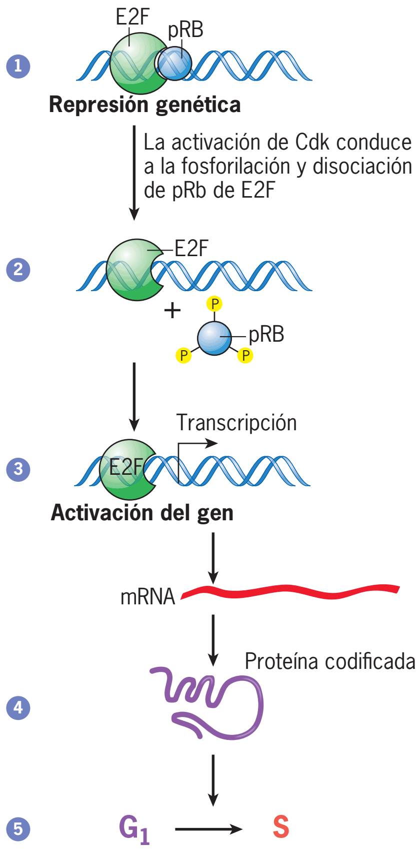


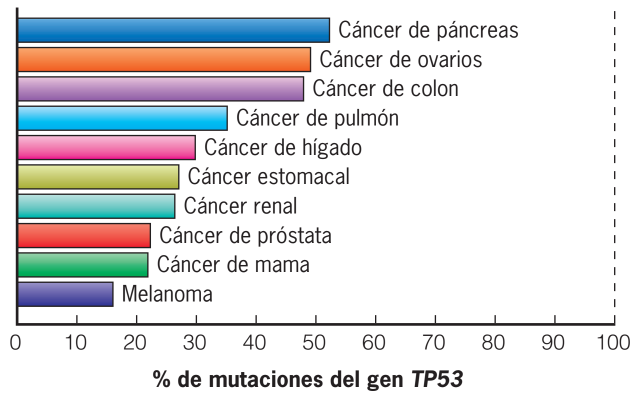

**FIGURA 16-12 Papel de pRB en el control de la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular.** Durante la mayor parte de la fase $G_1$, la pRB no fosforilada se une con la proteína E2F. El complejo E2F-pRB se une con sitios reguladores en las regiones promotoras de numerosos genes implicados en la progresión del ciclo celular, y actúa como un represor transcripcional que bloquea la expresión génica. La represión probablemente involucre la metilación de la lisina 9 de la histona H3 que modula la arquitectura de la cromatina (consúltese sección 12.3). La activación de la cinasa dependiente de ciclina (Cdk, *cyclin-dependent kinase*) conduce a la fosforilación de pRB, que ya no puede unirse a la proteína E2F (paso 2). En la ruta representada, la pérdida de la pRB unida convierte a la E2F unida con DNA en un activador transcripcional, lo que lleva a la expresión de los genes que se regulan (paso 3). El mRNA se traduce en proteínas (paso 4) que se requieren para la progresión de las células desde $G_1$ a la fase S del ciclo celular (paso 5). Se han identificado otras funciones de pRB pero no se consideran aquí.

## 16.7 Genes supresores de tumores: el gen *TP53*

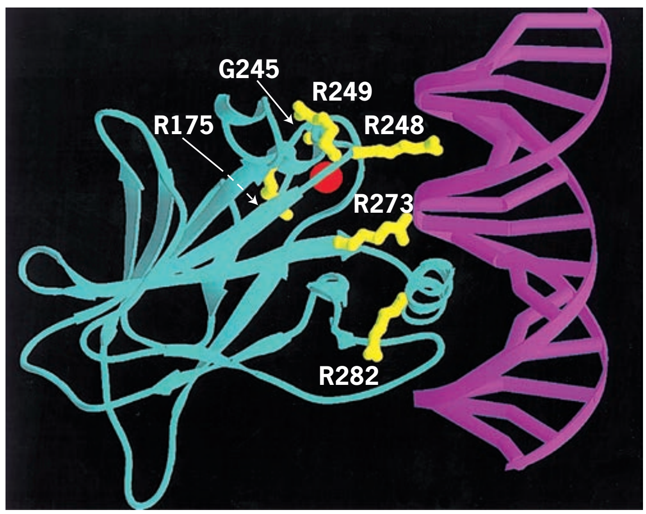
El gen *TP53* puede tener más nexos con el desarrollo del cáncer humano que cualquier otro componente del genoma. Recibe su nombre del producto que codifica, p53, que es un polipéptido que tiene una masa molecular de 53 000 daltones. En 1990, *TP53* fue reconocido como el gen supresor de tumores que, cuando está ausente, es responsable de un raro trastorno hereditario llamado síndrome de Li-Fraumeni. Las víctimas de esta enfermedad padecen una incidencia muy alta de varios tipos de cáncer, incluidos cáncer mamario y cerebral y leucemia. Al igual que los individuos con la forma hereditaria de retinoblastoma, las personas con síndrome de Li-Fraumeni heredan un alelo normal y uno anormal (o eliminado) del gen supresor de *TP53* y por tanto son altamente susceptibles a los cánceres que resultan de mutaciones aleatorias en el alelo normal.

### El papel de p53: guardián del genoma

La importancia de p53 como arma antitumoral es más evidente por el hecho de que *TP53* es el gen más comúnmente mutado en los cánceres humanos; aproximadamente la mitad de todos los tumores humanos contiene células con mutaciones puntuales o deleciones en ambos alelos de este gen (consúltese **FIGURA 16-13*a***). Además, los tumores compuestos de células con mutaciones de *TP53* se acompañan de un menor índice de supervivencia que los que tienen un gen nativo *TP53*. Sin duda, la eliminación funcional de *TP53* es un paso importante en la progresión de muchas células cancerosas hacia el estado maligno completo.




*a*)




*b*)

**FIGURA 16-13 Papel del gen supresor de tumores *TP53* en el cáncer humano.** *a*) Frecuencia con la que ambos alelos del gen *TP53* mutan en diferentes tipos de cáncer. Los datos se refieren a la forma más común de cada uno de estos 10 tipos de cáncer. *b*) La función de p53 es particularmente sensible a las mutaciones en su dominio de unión al DNA. p53 funciona como un tetrámero, cada subunidad consta de varios dominios con diferentes funciones. Esta imagen muestra un modelo de cinta del dominio de unión al DNA. Los seis residuos de aminoácidos mutados con más frecuencia en las moléculas de p53 que se han debilitado en los cánceres humanos se indican con una nomenclatura de una sola letra (consúltese figura 2-26). Estos residuos aparecen en, o cerca de, la interfaz proteína-DNA y afectan directamente la unión de la proteína al DNA o alteran su conformación.

FUENTE: *a*) Tomada de Janet E Dancey, *et al*. Reimpreso de *Cell* 2012;148:412, con autorización de Elsevier. *b*) Tomada de Y Cho, S Gorina, PD Jeffrey, *et al*. *Science* 1994;265:352. Reimpreso con autorización de AAAS.

¿Por qué es tan importante la presencia de p53 para evitar que una célula se vuelva maligna? Por un lado, p53 parece unirse a una lista muy larga de proteínas diferentes, así como al DNA, y está involucrada en una amplia gama de actividades celulares. En su función mejor estudiada, p53 sirve como factor de transcripción que actúa como un actor crucial en la respuesta de una célula al estrés. Cuando una célula sufre daño en el DNA, p53 reacciona mediante la alteración de la expresión de un gran número de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia. La importancia de la función de regulación de la transcripción de p53 es evidente en la figura 16-13*b*), que muestra la ubicación de las seis mutaciones más comunes para deshabilitar p53 en los cánceres humanos; todas ellas mapean en la región de la proteína que interactúa con el DNA. Uno de los genes mejor estudiados activados por p53 codifica una proteína llamada p21 que inhibe la cinasa dependiente de ciclina que normalmente conduce una célula a través del punto de revisión de $G_1$. A medida que aumenta el nivel de p53 en la célula $G_1$ dañada, se activa la expresión del gen *p21* y se detiene la progresión a través del ciclo celular (véase figura 14-9). Esto le proporciona a la célula tiempo para reparar el daño genético antes de que inicie la replicación del DNA. Cuando ambas copias del gen *TP53* en una célula mutan y su producto ya no es funcional, la célula ya no puede producir el inhibidor p21 o ejercer el control por retroalimentación que impide el ingreso a la fase S cuando no está preparada para hacerlo. Si no se repara el daño en el DNA, se producen células anormales que tienen el potencial de volverse malignas.

La detención del ciclo celular no es la única manera en que p53 protege a un organismo contra el desarrollo de cáncer. Como vía alternativa, p53 puede dirigir una célula con daños genéticos a lo largo de una vía que conduce a la muerte por apoptosis o necrosis, así libera al cuerpo de células con un potencial maligno. Se cree que p53 conduce la muerte celular a través de varias acciones, incluida la activación de la expresión del gen *BAX*, cuya proteína codificada inicia la apoptosis (véase figura 15-40). No todas las acciones de p53 dependen de activar la transcripción. La p53 también es capaz de unirse de forma directa a varios miembros de las proteínas de la familia Bcl-2 (p. 623) de una manera que estimula la apoptosis. Por ejemplo, p53 puede unirse a proteínas Bax en la membrana mitocondrial externa, lo que desencadena directamente la permeabilización de la membrana y la liberación de factores apoptóticos. Si ambos alelos de *TP53* se vuelven inactivos, una célula que tiene dañado el DNA no se destruye, aunque carezca de la integridad genética necesaria para el crecimiento controlado (obsérvese **FIGURA 16-14**). Varios estudios han demostrado que los tumores establecidos en ratones sufrirán un retroceso cuando se restablezca la actividad de sus genes p53. Este hallazgo sugiere que el desarrollo del tumor continúa en dependencia de la ausencia de un gen *TP53* funcional, incluso después de que sus células se vuelvan genéticamente inestables. Por estas razones, el desarrollo de terapias que restauran la función de p53 en células deficientes en p53 se ha convertido en un área activa de investigación. La terapia más avanzada basada en esta estrategia consiste en la inyección en el tumor de un adenovirus que porta un gen *TP53* nativo. Este enfoque se ha utilizado mucho en China, pero la FDA no ha aprobado un vector adenoviral similar en el momento de escribir este artículo.

El nivel de p53 en una célula sana en fase $G_1$ es muy bajo, lo que mantiene bajo control su acción potencialmente letal. Sin embargo, si una célula $G_1$ sufre daño genético, como ocurre si la célula está sometida a la luz ultravioleta o a carcinógenos químicos, la concentración de p53 se eleva con rapidez. Se puede obtener una respuesta similar tan sólo con la inyección a una célula de DNA con cadenas rotas. El aumento en los niveles de p53 no se debe al aumento de la expresión del gen, sino a un aumento en la estabilidad de la proteína. En las células sin estrés, p53 tiene un promedio de vida de unos pocos minutos. La proteína llamada MDM2 facilita la degradación de p53, se une a ella y la escolta fuera del núcleo hacia el citosol. Una vez en el citosol, MDM2 agrega moléculas de ubiquitina a la molécula p53, lo que lleva a su destrucción por un proteasoma (véase sección 12.21). ¿Cómo conduce el daño del DNA a la estabilización de p53? Vimos en la sección 14.5 que las personas que sufren de ataxia-telangiectasia carecen de una proteína cinasa llamada ATM y no pueden responder de forma adecuada a las radiaciones dañinas para el DNA. La ATM suele activarse después del daño en el DNA, y p53 es una de las proteínas a las que ATM fosforila. La versión fosforilada de la molécula p53 ya no puede interactuar con MDM2, que estabiliza las moléculas p53 existentes en el núcleo y les permite activar la expresión de genes como *p21* y *BAX* (véase figura 16-16).

Se han encontrado algunas células tumorales que contienen un gen *TP53* de tipo salvaje pero copias adicionales de *MDM2*. Se cree que estas células producen cantidades excesivas de MDM2, lo cual impide que la p53 crezca hasta los niveles requeridos para detener el ciclo celular o inducir la apoptosis después del daño al DNA (u otros estímulos oncogénicos). Se realiza un gran esfuerzo para desarrollar fármacos que bloqueen la interacción entre MDM2 y p53 en un intento por restaurar la actividad de p53 en las células cancerosas que retienen este supresor tumoral clave.

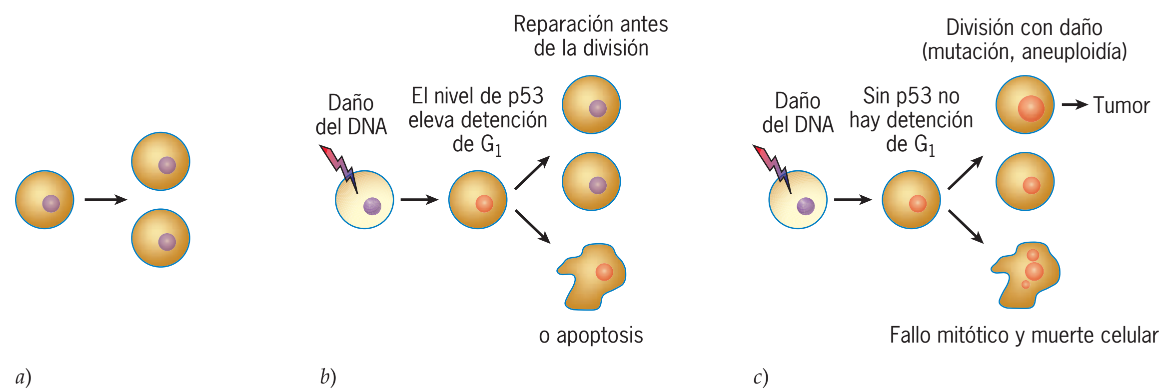



**FIGURA 16-14 Modelo de la función de p53.** *a*) La división celular normalmente no requiere la participación de p53. *b*) Sin embargo, si el DNA de una célula se daña como resultado de la exposición a mutágenos, el nivel de p53 aumenta y actúa para detener la progresión de la célula a través de $G_1$ o para dirigir la célula hacia la apoptosis. *c*) Si se desactivan ambas copias del gen *TP53*, la célula pierde la capacidad de detener el ciclo celular o de derivar la célula hacia la apoptosis luego del daño en el DNA. Como resultado, la célula muere por fallo de la mitosis o continúa su proliferación con anomalías genéticas que pueden conducirla a la formación de un tumor maligno.

FUENTE: *a-c*) DP Lane, reimpreso con autorización de *Nature* 1992;358:15; Copyright 1992. *Nature* by Nature Publishing Group. Reproducido con autorización de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

La relación entre MDM2 y p53 también se ha demostrado mediante el uso de genes knockout. Los ratones que carecen de un gen que codifica MDM2 mueren en una etapa temprana del desarrollo, probablemente porque sus células se someten a la apoptosis dependiente de p53. Esta interpretación está respaldada por el hallazgo de que los ratones que carecen de genes que codifican *tanto* MDM2 como p53 (dobles *knockout*) sobreviven hasta la edad adulta, pero son propensos al cáncer. Debido a que estos embriones no pueden producir p53, no requieren una proteína como MDM2 que facilite la destrucción de p53. Esta observación ilustra un principio importante en la genética del cáncer: incluso si un gen "crucial", como *RB* o *TP53,* carece de mutaciones o deleciones, su *función* puede afectarse como resultado de alteraciones en otros genes cuyos productos forman parte de la misma vía que el gen "crucial". En este caso, la sobreexpresión de MDM2 puede tener el mismo efecto que la ausencia de p53. Mientras que se bloquee la vía supresora de tumores, no es necesario que se altere el gen supresor tumoral mismo. Numerosos estudios indican que las vías p53 y pRB deben desactivarse, de una forma u otra, para permitir la progresión de la mayoría de las células tumorales.

Debido a su capacidad para desencadenar apoptosis, la p53 desempeña un papel fundamental en el tratamiento del cáncer mediante radiación y quimioterapia. Se asumió durante muchos años que las células cancerosas son más susceptibles que las células normales a los medicamentos y la radiación porque las células cancerosas se dividen con más rapidez. Pero algunas células cancerosas se dividen con más lentitud que sus contrapartes normales, sin embargo, son aún más sensibles a los fármacos y la radiación. Una teoría alternativa sugiere que las células normales son más resistentes a los fármacos o la radiación porque, una vez que sufren daño genético, detienen su ciclo celular hasta que el daño se repara o se someten a apoptosis. En contraste, las células cancerosas que han sufrido daño en el DNA tienen más probabilidad de sufrir apoptosis, siempre y cuando posean un gen *TP53* en funcionamiento. Si las células cancerosas pierden la función de p53, a menudo no pueden dirigirse hacia la apoptosis y se vuelven altamente resistentes a tratamientos posteriores (véase **FIGURA 16-15**). Esta puede ser la razón principal por la que los tumores que típicamente carecen de un gen *TP53* funcional (p. ej., cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de páncreas) reaccionan mucho menos a la radiación y la quimioterapia que los tumores con un tipo nativo del gen (p. ej., cáncer testicular y leucemias linfoblásticas agudas de la infancia.

## El papel de p53 en la promoción de la senescencia

Hemos visto cómo p53 puede dirigir una célula cancerosa potencial hacia la detención del crecimiento o apoptosis. Estudios recientes indican que la p53 también controla las vías de señalización que conducen a la senescencia celular, otro mecanismo que se ha desarrollado como una barrera que impide que las células inmanejables se conviertan en tumores malignos. A diferencia de las células apoptóticas, las células senescentes pueden permanecer vivas y metabólicamente activas, pero se detienen de forma permanente en un estado en el que no se dividen, como sucede con los melanocitos senescentes que se encuentran en los lunares (analizados en la p. 638). En otros casos, células inmunes fagocíticas ingieren las células senescentes. La senescencia se desencadena en una célula normal mediante la activación experimental de un oncogén, como el Ras, que puede ocurrir con cierta frecuencia durante las actividades diarias de las células en división en un tejido normal. Los estudios sugieren que la activación del oncogén desencadena un periodo de división acelerada después del cual el proceso de senescencia se efectúa y finaliza de manera súbita. Aparentemente este es el proceso de formación de los lunares benignos. Una de las vías que conducen a la senescencia implica la expresión de un gen supresor de tumores llamado *INK4a*, que a menudo se desactiva en los cánceres humanos (consúltese la tabla 16-1). El *INK4a* codifica por separado dos proteínas supresoras de tumores (proteínas que se convierten en medios alternativos de medición de mRNA): p16, que es un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina necesarias para la progresión a través del ciclo celular, y ARF, que estabiliza p53 mediante la inhibición de MDM2. No está claro el papel exacto de p53 en la dirección de las células hacia el estado senescente, pero la inactivación del gen

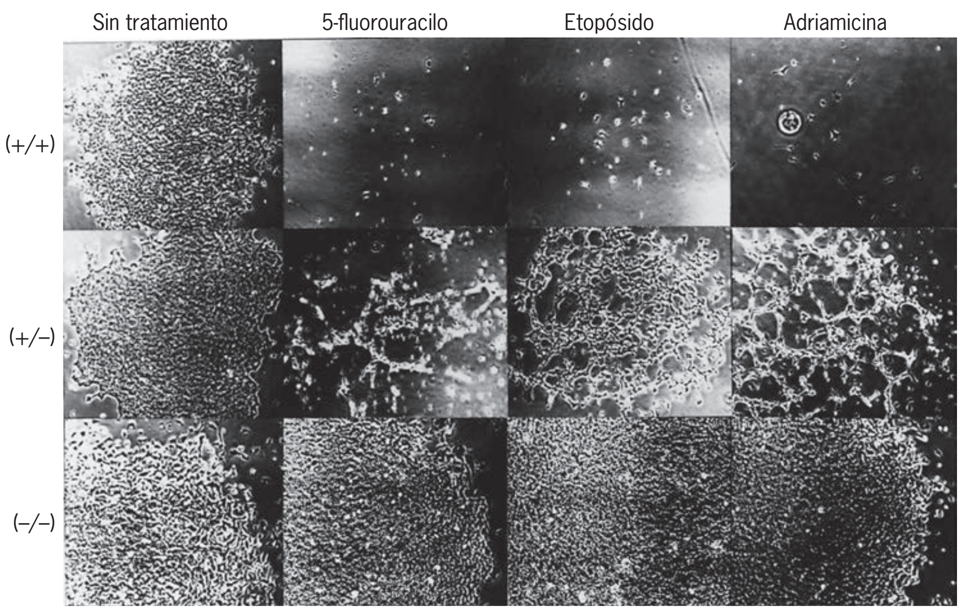



**FIGURA 16-15 Demostración experimental del papel de p53 en la supervivencia de células tratadas con agentes quimioterapéuticos.** Las células se cultivaron a partir de ratones que tenían dos alelos funcionales del gen que codifica p53 (fila superior), un alelo funcional del gen (fila central) o que carecían de un alelo funcional del gen (fila inferior). Los cultivos de cada una de estas células se hicieron en ausencia de un agente quimioterapéutico (primera columna) o en presencia de uno de los tres compuestos indicados en la parte superior de las otras tres columnas. Es evidente que los compuestos tuvieron un efecto drástico en la detención del crecimiento y la inducción de la muerte celular (apoptosis) en células normales, mientras que las células que carecen de p53 continuaron su proliferación en presencia de estos compuestos.

FUENTE: Tomada de Scott W Lowe, HE Ruley, T Jacks, DE Housman, *Cell* 1993;74:959, con autorización de Elsevier.

*TP53* dentro de las células senescentes puede hacer que las células reanuden su proceso hasta convertirse en células malignas.

Si p53 mueve una célula hacia la detención del ciclo celular, la apoptosis o la senescencia, depende aparentemente del tipo de modificaciones postraduccionales a las que está sometido. Como en el caso de las histonas nucleares (p. 465), las modificaciones incluyen la fosforilación, la acetilación, la metilación y la ubiquitinación y afectan a más de tres docenas de residuos dentro de la molécula p53. Además, el hecho de que 1) como alternativa el gen transcrito *TP53* se une en numerosas isoformas p53, 2) estas proteínas p53 interactúan con disímiles proteínas y 3) se encontró que p53 influye en otros mecanismos importantes relacionados con los tumores (por ejemplo, la reparación del DNA, el metabolismo de la glucosa y la autofagia) hace más complejo el papel de p53. El análisis de los roles de estos diversos factores en la función de esta proteína "multitarea" será un desafío abrumador.

**REPASO**

1. ¿Por qué se describe p53 como el "guardián del genoma"?
2. Diga tres mecanismos mediante los cuales p53 actúa para prevenir que una célula se vuelva maligna.

## 16.8 Otros genes supresores de tumores

Aunque las mutaciones en *RB* y *TP53* están asociadas con una gran variedad de tumores malignos humanos, las mutaciones en otros genes supresores de tumores se detectan sólo en algunos tipos de cáncer.

La *poliposis adenomatosa colónica familiar* (FAP, *familial adenomatous polyposis*) es un trastorno hereditario en el que los individuos desarrollan cientos, incluso miles, de pólipos premalignos (adenomas) de células epiteliales que recubren la pared del colon. Si no se eliminan, es muy probable que las células dentro de algunos de estos pólipos progresen al estado maligno completo. Se encontró que las células de pacientes con esta condición contenían una deleción de una pequeña parte del cromosoma 5, que posteriormente se identificó como el sitio del gen supresor de tumores llamado poliposis adenomatosa colónica, o *APC* (*adenomatous polyposis coli*). Quien hereda una deleción en APC se encuentra en una posición similar a la del que hereda una deleción en *RB*: si el segundo alelo del gen está mutado en una célula determinada, se pierde el valor protector de la función del gen. La pérdida del segundo alelo de *APC* hace que la célula pierda el control del crecimiento y prolifere hasta formar un pólipo en lugar de diferenciarse en células epiteliales normales de la pared intestinal. La conversión de células en un pólipo al estado más maligno, que se caracteriza por la capacidad para producir metástasis e invadir otros tejidos, se obtiene presumiblemente por la acumulación de mutaciones adicionales, incluidas las de *TP53* (véase figura 16-20). Los genes *APC* mutados se encuentran no sólo en las formas hereditarias de cáncer de colon, sino también en la mayoría de los tumores colónicos esporádicos, lo que sugiere que el gen desempeña un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Se sabe que *APC* suprime la ruta Wnt, que activa la transcripción de genes (p. ej., *MYC* y *CCND1*) que promueven la proliferación celular. La *APC* también se ha identificado como una proteína de unión al extremo positivo de los microtúbulos y se cree que desempeña un papel en la unión de los microtúbulos a los cinetocoros de los cromosomas mitóticos. Por tanto, la pérdida de la función de *APC* podría conducir directamente a una segregación anormal del cromosoma y aneuploidía (p. 566). La presencia de DNA de *APC* mutado se encontró en la sangre de personas con cáncer de colon en etapa temprana, lo que aumenta la posibilidad de una prueba diagnóstica para el trastorno.

Se estima que el cáncer de mama afecta aproximadamente a una de cada ocho mujeres que viven en Estados Unidos, Canadá y Europa. De estos casos, 5 a 10% se debe a la herencia de un gen que predispone al individuo al desarrollo de la enfermedad. Después de un esfuerzo intensivo por parte de varios laboratorios, a mediados de la década de 1990 se identificaron dos genes llamados *BRCA1* y *BRCA2* como responsables de la mayoría de los casos hereditarios de cáncer de mama. Las mutaciones *BRCA* también predisponen a una mujer al desarrollo del cáncer de ovario, que tiene un índice de mortalidad muy alto.

Se señaló en la sección 14.5, que las células poseen puntos de control que detienen la progresión del ciclo celular después del daño en el DNA. Las proteínas BRCA son parte de uno o más complejos de proteínas grandes que responden al daño del DNA y activan su reparación mediante recombinación homóloga. Las células con proteínas BRCA mutantes acumulan roturas cromosómicas y exhiben un cariotipo altamente aneuploide. En las células con un gen *TP53* funcional, la falla en la reparación del daño en el DNA lleva a la activación de p53, lo que hace que la célula detenga el progreso del ciclo celular o se someta a apoptosis, como se ilustra en la **FIGURA 16-16**.

Hemos visto en este capítulo que la apoptosis es uno de los principales mecanismos del cuerpo para deshacerse de las posi-

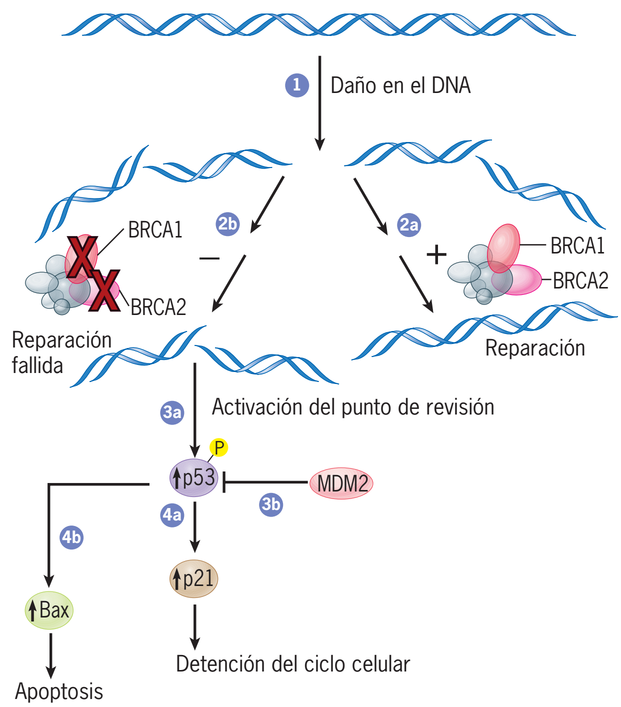



**FIGURA 16-16 El daño en el DNA inicia la actividad de varias proteínas codificadas por los genes supresores de tumores y los protooncogenes.** En esta figura simplificada, se advierte que el daño en el DNA causa roturas de la doble cadena del DNA (paso 1) que son reparadas por un complejo multiproteico propuesto que incluye BRCA1 y BRCA2 (paso 2a). Las mutaciones en cualquiera de los genes que codifican estas proteínas pueden bloquear el proceso de reparación (paso 2b). Si el daño del DNA no se repara, se activa un punto de revisión que conduce a un aumento en el nivel de actividad de p53 (paso 3a). La proteína p53 se inhibe normalmente por la interacción con la proteína MDM2 (paso 3b). La p53 es un factor de transcripción que activa la expresión de 1) el gen *p21* (paso 4a), cuyo producto (p21) causa la detención del ciclo celular, o 2) el gen *BAX* (paso 4b), cuyo producto (Bax) causa apoptosis. La activación de p53 también puede promover la senescencia celular, pero la vía no está clara.

FUENTE: Reimpreso con autorización de J Brugarolas y T Jacks, *Nature Med* 1997;3:721, copyright 1997, *Nature Medicine* by Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

bles células tumorales. El mecanismo de la apoptosis se discute en el último capítulo, al igual que las vías que promovían la supervivencia en lugar de la destrucción celular. La vía de supervivencia celular mejor estudiada implica la activación de una cinasa llamada PKB (AKT) por el fosfoinosítido $PIP_3$. El $PIP_3$, a su vez, está formado por la actividad catalítica de la lípido cinasa PI3K (véase figura 15-25). La activación de la vía PI3K/PKB conduce a una mayor probabilidad de que una célula sobreviva a un estímulo que normalmente llevaría a su destrucción. El hecho de que una célula viva o muera después de un fenómeno particular depende en gran medida del equilibrio entre las señales que fomentan y las que impiden la apoptosis. Las mutaciones que afectan este equilibrio, como las que contribuyen a la sobreexpresión de PKB o PI3K, pueden cambiar este equilibrio en favor de la supervivencia celular, lo cual suministra a una célula cancerosa potencial una ventaja tremenda. Otra proteína que puede afectar el equilibrio entre la vida y la muerte de una célula es la fosfatasa de lípidos, PTEN, la cual retira el grupo fosfato de la posición 3 de $PIP_3$ y convierte la molécula en $PI(4,5)P_2$, que no puede activar PKB. Las células en las que ambas copias del gen *PTEN* están desactivadas tienden a tener un nivel demasiado alto de $PIP_3$, lo que conduce a una población con actividad excesiva de moléculas PKB. Cuando se introduce un gen *PTEN* normal en las células tumorales que carecen de una copia funcional del gen, estas suelen sufrir apoptosis, como es de esperar. Al igual que los otros genes supresores de tumores enumerados en la tabla 16-1, las mutaciones en *PTEN* causan una enfermedad hereditaria rara caracterizada por un mayor riesgo de cáncer, y dichas mutaciones también se encuentran en una variedad de cánceres esporádicos.

La mutación o deleción no es el único mecanismo por el cual pueden desactivarse los genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores, como *BRCA1* o *PTEN*, a menudo pierden su función como resultado de mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA o la modificación de histonas, la cual silencia la transcripción del gen (consúltese sección 12.17).

**REPASO**

1. ¿Qué gen es responsable de causar la poliposis adenomatosa familiar? ¿Cuál es su papel habitual en la célula?
2. Describa el papel de las proteínas BRCA y cómo su ausencia puede conducir al desarrollo del cáncer.

## 16.9 Oncogenes

Como se describió anteriormente, los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno. Los oncogenes se derivan de los protooncogenes (p. 638), que son genes que codifican proteínas que tienen una función en la célula normal. Inicialmente, se identificaron numerosos oncogenes como parte de los genomas de los virus tumorales de RNA, pero muchos más se han identificado debido a su importancia en la oncogénesis, según se determinó en animales de laboratorio o en muestras de tumores humanos. Diferentes oncogenes se activan en distintos tipos de tumores, lo que refleja variaciones en las vías de señalización que operan en diversos tipos de células. El oncogén mutado más frecuentemente en tumores humanos es *RAS*, que codifica una proteína de unión a GTP (RAS) la cual funciona como interruptor de apagado para una vía de señalización clave que controla la proliferación celular (consúltese sección 15.11) y el metabolismo (véase figura 16-18).[3] Los mutantes *RAS* oncogénicos usualmente codifican una proteína cuya actividad de GTPasa no puede estimularse, y esto deja a la molécula en una forma activa unida a GTP que emite señales de proliferación continua a lo largo del camino. A pesar de los grandes esfuerzos para desarrollar estrategias anti-RAS para la terapia del cáncer, aún no se han aprobado medicamentos que bloqueen la función de RAS. Las funciones de varios oncogenes se resumen en la **FIGURA 16-17** y se explican a continuación.[4]

### Oncogenes que codifican factores de crecimiento o sus receptores

La primera conexión entre los oncogenes y los factores de crecimiento se realizó en 1983, cuando se descubrió que el virus del sarcoma simio causante de cáncer contenía un oncogén (*sis*) derivado del gen celular para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), una proteína presente en la sangre humana. Las células cultivadas que se transforman con este virus secretan grandes cantidades de PDGF al medio, lo cual las hace proliferar de manera incontrolada. La sobreexpresión de PDGF se ha implicado en el desarrollo de tumores cerebrales (gliomas).

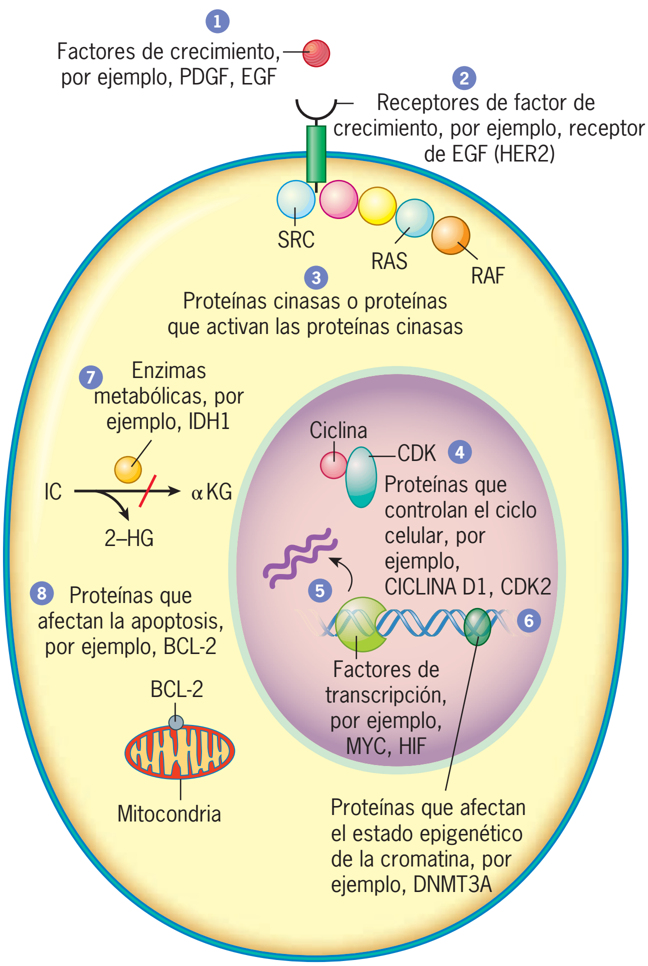



**FIGURA 16-17 Diagrama esquemático que resume los tipos de proteínas codificadas por protooncogenes**. Estos incluyen factores de crecimiento (1), receptores para factores de crecimiento (2), proteínas cinasas y las proteínas que las activan (3), proteínas que regulan el ciclo celular (4), factores de transcripción (5), proteínas que modifican la cromatina (6), enzimas metabólicas (7) y proteínas que inhiben la apoptosis (8). Las proteínas involucradas en la mitosis, invasión tisular y metástasis no están incluidas.

[3] En realidad, el genoma humano contiene tres genes *RAS* diferentes y tres genes *RAF* distintos que se activan en varios tejidos. De estos, *KRAS* y *BRAF* son los que se vinculan con mayor frecuencia en la formación de tumores.

[4] Se remite al lector a la sección "Perspectiva humana" del capítulo 7 (véase sección 7.8) para una discusión de los genes que codifican las moléculas de la superficie celular y las proteasas extracelulares que tienen un papel importante en la invasión de tejidos y la metástasis.

Se descubrió que otro virus oncogénico, el virus de la eritroblastosis aviar, es portador de un oncogén (*erbB*) que codifica un receptor del EGF al que le falta parte del dominio extracelular de la proteína que se une al factor de crecimiento. Se esperaría que el receptor alterado fuera incapaz de emitir señales a la célula para dividirse, pero sucede justo lo contrario. Esta versión alterada del receptor estimula la célula de forma constitutiva, es decir, la estimulación es independiente de si el factor de crecimiento está presente en el medio. Esta es la razón por la cual las células cultivadas que llevan el gen alterado proliferan de manera incontrolada. Se descubrió que varios cánceres humanos espontáneos contienen células con alteraciones genéticas que afectan los receptores del factor de crecimiento, incluido el EGFR. Con más frecuencia, las células malignas contienen un número mucho mayor de receptores en sus membranas plasmáticas que las células normales. La presencia de receptores en exceso hace que las células sean sensibles a concentraciones mucho más bajas del factor de crecimiento, por lo que se estimulan para dividirse en condiciones que no afectarían a las células normales. Como se explica más adelante, los receptores del factor de crecimiento se han convertido en un objetivo favorito para los anticuerpos terapéuticos, que se unen al dominio extracelular del receptor, y para los inhibidores de moléculas pequeñas, que se unen al dominio de tirosina cinasa intracelular del receptor.

## Oncogenes que codifican las proteínas cinasas citoplásmicas

Las proteínas cinasas sobreactivadas funcionan como oncogenes al generar señales que conducen a una proliferación o supervivencia celular inadecuada. Por ejemplo, Raf, es una proteína cinasa de serina-treonina que encabeza la cascada de la cinasa de MAP, la principal vía de señalización para controlar crecimiento en las células (véase sección 15.11). Es evidente que Raf está bien posicionada para causar estragos dentro de una célula si su actividad enzimática se ve alterada como resultado de la mutación. Al igual que con los receptores del factor de crecimiento y Ras, las mutaciones que convierten a Raf en una enzima que permanece en la posición de "encendido" son más propensas a convertir el protooncogén en un oncogén y contribuyen a la pérdida de control de crecimiento de la célula. Raf está más relacionada con el melanoma, donde las mutaciones de *BRAF* desempeñan un papel causante del desarrollo de aproximadamente 70% de estos cánceres. Otro grupo de cinasas citoplásmicas que a menudo están desreguladas en el cáncer son las cinasas dependientes de ciclina, especialmente Cdk4 y Cdk6 (consúltese figura 14-8). Cyclin D1, un regulador de estos Cdks, también es un oncogén frecuente.

El primer oncogén descubierto, el *SRC*, también es una proteína cinasa, pero fosforila los residuos de tirosina en sustratos de proteínas en lugar de residuos de serina y treonina. La transformación de una célula por un virus tumoral que contiene *src* se acompaña por la fosforilación de una gran variedad de proteínas. Entre los sustratos aparentes de Src se incluyen las proteínas involucradas en la transducción de señal, el control del citoesqueleto y la adhesión celular. Por razones desconocidas, las mutaciones de *SRC* aparecen rara vez entre el repertorio de cambios genéticos en células tumorales humanas.

## Oncogenes que codifican factores de transcripción

Varios oncogenes codifican proteínas que actúan como factores de transcripción. La progresión de las células a través del ciclo celular requiere la activación (o represión) oportuna de una gran variedad de genes cuyos productos contribuyen de diversas maneras al crecimiento y la división celular. No es sorprendente, por tanto, que las alteraciones en las proteínas que controlan la expresión de estos genes puedan trastornar en grado notorio los patrones normales de crecimiento celular. Probablemente el oncogén mejor estudiado cuyo producto actúa como un factor de transcripción es *MYC*.

El Myc regula la expresión de un gran número de proteínas y RNA no codificantes (rRNA, tRNA y miRNA) implicados en el crecimiento y la proliferación celulares. Cuando la expresión de *MYC* se bloquea selectivamente, se obstruye la progresión de la célula a través de $G_1$. El gen *MYC* es uno de los protooncogenes que se alteran con más frecuencia en los cánceres humanos, a menudo se amplifica dentro del genoma o se reorganiza como resultado de una translocación cromosómica. Se cree que estos cambios cromosómicos eliminan el gen *MYC* de sus influencias regulatorias normales y aumentan su nivel de expresión en la célula, lo que produce un exceso de la proteína Myc. Uno de los tipos de cáncer más comunes entre las poblaciones de África, llamado linfoma de Burkitt, es el resultado de la translocación de un gen *MYC* a una posición adyacente a un gen de anticuerpo. La enfermedad se presenta principalmente en personas que también se infectaron con el virus de Epstein-Barr. Este mismo virus causa sólo infecciones menores (p. ej., mononucleosis) en personas que viven en países occidentales y no está asociado con la oncogénesis.

## Oncogenes que codifican proteínas que afectan el estado epigenético de la cromatina

Como se discutió en el capítulo 12, dos de los factores más importantes para determinar el estado epigenético de la cromatina son 1) si los sitios particulares en el DNA de los promotores de genes están o no metilados y 2) las modificaciones particulares presentes en las colas de ciertas histonas nucleares dentro de los nucleosomas de estos mismos promotores de genes. La metilación del DNA tiende a silenciar los genes, mientras que las modificaciones de las histonas son capaces de activar o reprimir la transcripción del gen. Estudios recientes indican que una serie de oncogenes codifican proteínas que afectan la metilación del DNA o las modificaciones de histonas. Estos incluyen DNA metiltransferasas, histonas acetilasas y desacetilasas, histonas metiltransferasas y desmetilasas, y proteínas presentes dentro de los complejos de remodelación de cromatina. Las mutaciones en cualesquiera de estas clases de genes pueden promover la oncogénesis al aumentar o disminuir la transcripción de los genes involucrados en las diversas vías de señalización y regulación que afectan la proliferación celular, la supervivencia, la migración y otras funciones. Para citar sólo un ejemplo, la leucemia mieloide aguda se caracteriza por mutaciones recurrentes en *DNMT3A*, un gen cuyo producto participa en el mantenimiento de los patrones de metilación del DNA durante la replicación del DNA. Una reducción en el nivel de metilación del DNA podría conducir a un mayor movimiento de elementos intercambiables, lo que causaría inestabilidad genética, así como un aumento de la transcripción de ciertos protooncogenes. A la inversa, se sabe que un aumento en el nivel de metilación del DNA de las regiones promotoras de los genes supresores de tumores silencia la expresión de genes que ejercen una influencia inhibitoria clave en la oncogénesis.

## Oncogenes que codifican enzimas metabólicas

Se mencionó en la sección 16.1 que las células tumorales dependen mucho más de la glucólisis que las células normales. Esta es sólo una de las principales diferencias en el metabolismo entre las células normales y las tumorales. Otra diferencia, que fue uno de los descubrimientos sorprendentes que surgieron de los estudios de secuenciación del genoma, fue la presencia repetida de mutaciones en la enzima del ciclo TCA isocitrato deshidrogenasa (IDH1 e IDH2) en las células tumorales de pacientes con glioblas-

toma (cáncer cerebral) y con leucemia mieloide aguda (AML, *acute myeloid leukemia*). Estas mutaciones hacen que la enzima pierda su actividad normal de convertir el isocitrato en α-cetoglutarato (consúltese figura 5-7) y, en cambio, convierte el sustrato en un metabolito anormal llamado 2-hidroxiglutarato (2-HG), que se acumula a niveles altos en el tumor. Los niveles elevados de 2-HG tienen un impacto en varios procesos que incluyen la desmetilación de histonas y la metilación del DNA. Se propone que la interrupción de estos procesos epigenéticos probablemente daría lugar a una regulación anormal de la expresión génica dentro de las células tumorales.



## Oncogenes que codifican productos que afectan la apoptosis

La apoptosis es uno de los mecanismos clave del cuerpo para deshacerse de las células tumorales en una etapa temprana en su progresión hacia la malignidad. Por consiguiente, se esperaría que cualquier alteración que disminuya la capacidad de una célula para autodestruirse aumente la probabilidad de que esa célula dé lugar a un tumor. Esto fue evidente en la discusión previa sobre el papel de la vía PI3K/PKB en la supervivencia celular y la oncogénesis (p. 597). Al tener esto en cuenta, no es sorprendente que tanto PI3K como PKB estén codificados por oncogenes documentados.[5] El oncogén más estrechamente vinculado a la apoptosis es *BCL-2*, que codifica una proteína unida a la membrana que inhibe la apoptosis (p. 623).

El papel de *BCL-2* en la apoptosis se revela con mayor claridad en los fenotipos de ratones knockout que carecen de un gen *BCL-2*. Una vez formados, los tejidos linfoides de estos ratones experimentan una regresión drástica como resultado de una apoptosis diseminada. Al igual que con *MYC*, el producto del gen *BCL-2* se vuelve oncogénico cuando se expresa en niveles mayores de lo normal, como puede ocurrir cuando el gen se traslada a un sitio anormal en el cromosoma. Ciertos cánceres linfoides humanos (llamados linfomas foliculares de células B) se vinculan con la translocación del gen *BCL-2* junto a un gen que codifica la cadena pesada de las moléculas de anticuerpos. Se sugiere que la sobreexpresión del gen *BCL-2* conduce a la supresión de la apoptosis en los tejidos linfoides, lo que permite que las células anormales proliferen para formar tumores linfoides. El gen *BCL-2* también puede desempeñar un papel en la reducción de la eficacia de la quimioterapia al mantener vivas y en proliferación las células tumorales a pesar del daño causado por el tratamiento farmacológico.

En las últimas secciones, hemos analizado algunos de los supresores de tumores más importantes y los oncogenes involucrados en la oncogénesis. La **FIGURA 16-18** proporciona una visión general simplificada de algunas de estas proteínas y las vías de señalización en las que operan. Los supresores de tumores y las vías supresoras de tumores se muestran en rojo, los oncogenes y las vías de promoción de tumores se muestran en azul. Las funciones básicas de cada uno de los supresores de tumores y oncogenes representados en la figura se indican en la leyenda de la figura 16-18. La notable diversidad en las actividades de proteínas que pueden contribuir a la oncogénesis es evidente a partir de esta figura.

[5] Las mutaciones en *PI3K* o *PKB/AKT* son oncogénicas por razones distintas a su función en la supervivencia celular. Por ejemplo, la vía PI3K es un impulsor principal de la ruta aeróbica glucolítica característica de las células tumorales (discutido en la sección 16.1). Esto ocurre por la activación de los factores de transcripción HIF y MYC, que aceleran la expresión de genes que codifican transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas.

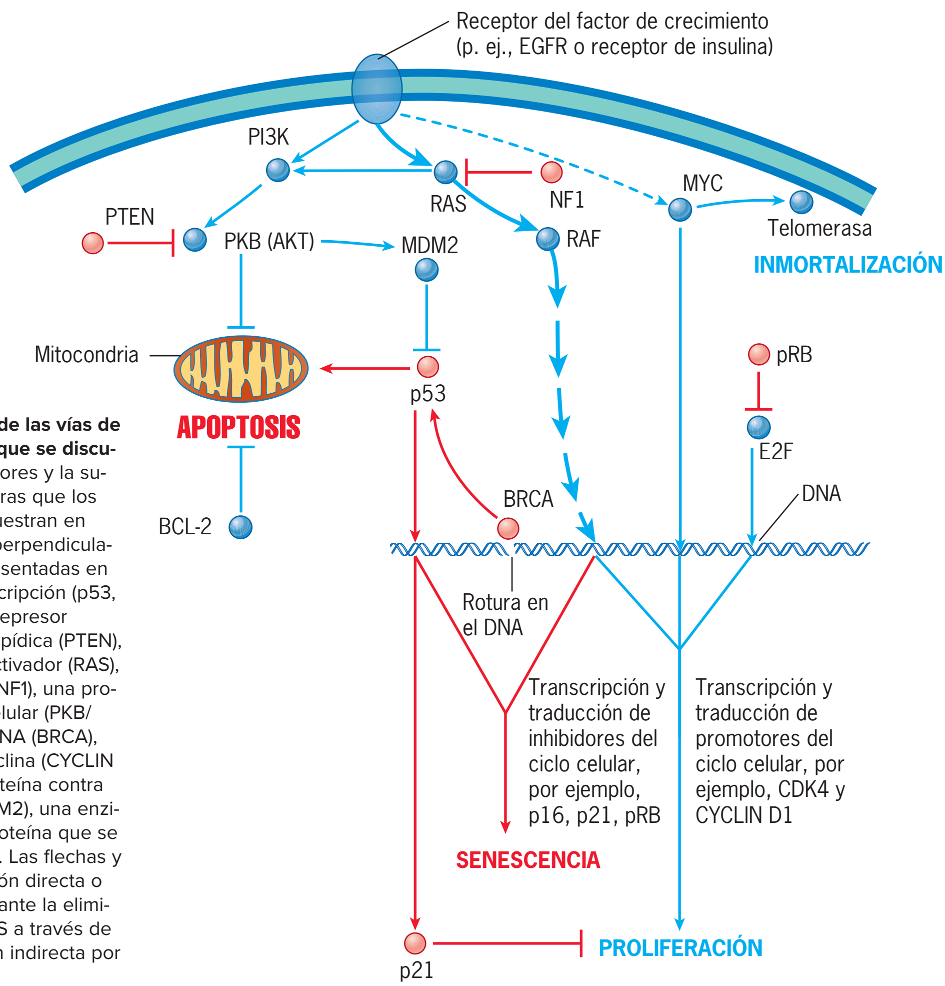



**FIGURA 16-18 Descripción general de varias de las vías de señalización involucradas en la oncogénesis que se discutieron en esta sección.** Los supresores de tumores y la supresión de tumores se muestran en rojo, mientras que los oncogenes y la estimulación de tumores se muestran en azul. Las flechas indican activación, las líneas perpendiculares indican inhibición. Entre las proteínas representadas en esta figura se encuentran los factores de transcripción (p53, MYC y E2F), un activador transcripcional o correpresor (pRB), una lípido cinasa (PI3K) y una fosfatasa lipídica (PTEN), una tirosina cinasa citoplasmática (RAF) y su activador (RAS), una proteína activadora de GTPasa para RAS (NF1), una proteína cinasa que promueve la supervivencia celular (PKB/AKT), una proteína que detecta roturas en el DNA (BRCA), subunidades de una cinasa dependiente de ciclina (CYCLIN D1 y CDK4 ), un inhibidor de Cdk (p21), una proteína contra la apoptosis (BCL-2), una ubiquitina ligasa (MDM2), una enzima que prolonga el DNA (telomerasa) y una proteína que se une a los factores de crecimiento (p. ej., EGFR). Las flechas y líneas no representan necesariamente activación directa o inhibición. Por ejemplo, PTEN inhibe PKB mediante la eliminación de un fosfato de $PIP_3$ y EGFR activa RAS a través de GRB2 y SOS. La línea discontinua indica acción indirecta por activación de la expresión del gen *MYC*.

**REPASO**

1. ¿Qué tipos de proteínas están codificadas por los protooncogenes y cómo las mutaciones en cada tipo de protooncogén provocan que una célula se vuelva maligna?

## 16.10 Fenotipo mutador: genes mutantes involucrados en la reparación del DNA

Si uno considera el cáncer como una enfermedad derivada de alteraciones en el DNA de las células somáticas, entonces se infiere que cualquier actividad que incremente la frecuencia de mutaciones genéticas, es posible que aumente el riesgo de desarrollar cáncer. Como se discutió en el capítulo 13, los nucleótidos que presentan alteraciones químicas o los nucleótidos que se incorporan de manera incorrecta durante la replicación se eliminan selectivamente de la cadena de DNA mediante la reparación del DNA. Los procesos de reparación del DNA requieren esfuerzos conjuntos de un número sustancial de proteínas, incluidas las proteínas que reconocen la lesión, eliminan una porción de la cadena que contiene la lesión y sustituyen el segmento faltante con nucleótidos complementarios. Si alguna de estas proteínas es defectuosa, se puede esperar que la célula afectada muestre un índice de mutaciones demasiado alto, descrito como un "fenotipo mutador". Es probable que las células con un fenotipo mutador incurran en mutaciones secundarias en ambos genes supresores de tumores y oncogenes, lo que aumenta su riesgo de volverse malignas.

**REPASO**

1. Describa el fenotipo mutador.

## 16.11 MicroRNA: un nuevo participante en la genética del cáncer

Recuerde de la sección 11.12 que los microRNA son pequeños RNA reguladores que regulan negativamente la expresión de los mRNA blanco. Puesto que los cánceres surgen como resultado de una expresión genética anormal, no sería sorprendente descubrir que los miRNA están involucrados, de alguna manera, en la oncogénesis. En 2002, se informó que el *locus* que codifica dos miRNA, *miR-15a* y *miR-16*, sufrían deleción o subexpresión en la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica. Más tarde se demostró que estos dos miRNA inhiben la expresión del mRNA que codifica la proteína antiapoptótica BCL-2, un conocido protooncogén. En ausencia de los miRNA, la proteína oncogénica BCL-2 se sobreexpresa, lo que promueve el desarrollo de la leucemia. Debido a que estos miRNA inhiben la oncogénesis, pueden considerarse supresores de tumores. Cuando las células leucémicas que carecen de *miR-15a* y *miR-16* fueron diseñadas genéticamente para volver a expresar estos RNA, se sometieron a una apoptosis, como se esperaría si se restableciera una actividad supresora del tumor faltante. El *locus* que codifica *miR-15a* y *miR-16* también se elimina en otros tipos de cánceres, lo que sugiere que tiene una importancia generalizada en la supresión de tumores. La expresión de dos de los oncogenes humanos más importantes, *RAS* y *MYC*, también ha demostrado ser inhibida por un miRNA, a saber, *let-7*, que fue el primer miRNA que se descubrió (consúltese sección 11.12). También se ha demostrado que el p53 supresor de tumores regula la expresión de numerosos miRNA, y está regulado transcripcionalmente por otros miRNA.

Algunos miRNA actúan más como oncogenes que como supresores de tumores. Un grupo específico de genes de miRNA, por ejemplo, se sobreexpresa durante la formación de ciertos linfomas humanos. La sobreexpresión de estos miRNA puede ocurrir porque el grupo de genes que los codifica está presente en un mayor número (amplificado) en las células tumorales, o puede ocurrir porque el grupo de genes se transcribe en exceso como resultado de factores de transcripción muy activos, incluido el MYC. Cuando los ratones están diseñados genéticamente para sobreexpresar estos miRNA particulares, los animales desarrollan linfomas como se predeciría si los genes que los codifican actuaran como oncogenes. La expresión anormal de miRNA también se ha implicado como un factor causal en la invasión de las células tumorales y la metástasis, lo que eleva el interés en estos RNA, incluso a un nivel más alto.

Varios estudios de micromatrices que analizan grandes cantidades de estos diminutos RNA reguladores sugieren que la mayoría de los cánceres humanos tienen un perfil de expresión de miRNA característico, al igual que tienen un perfil de expresión de mRNA característico. Estos perfiles de expresión de miRNA pronto pueden servir como biomarcadores sensibles y precisos, para identificar el tipo exacto de tumor que una persona está sufriendo y el mejor camino de tratamiento. Los investigadores también están indagando de manera activa el uso de miRNA como posibles terapias contra el cáncer. Puede ser posible, por ejemplo, tratar a pacientes con RNA sintéticos que actúen como "esponjas de miRNA". Los RNA terapéuticos de esta clase tendrían secuencias complementarias a los miRNA oncogénicos y actuarían para unir y secuestrar dichos miRNA, y así bloquear su actividad cancerígena.

**REPASO**

1. Discuta cómo la presencia o ausencia de microRNA particulares influye en el desarrollo del cáncer.

## 16.12 El genoma del cáncer

Todos los cánceres surgen como resultado de alteraciones genéticas. Como se evidenció en la discusión anterior, los genes involucrados en la oncogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma, cuyos productos están involucrados en actividades tales como la progresión de una célula a través del ciclo celular, la adhesión de una célula a sus vecinos, la apoptosis y la reparación del daño en el DNA. Analizados en su conjunto, cientos de genes diferentes se han identificado como "genes del cáncer", es decir, genes que se cree sean los promotores del desarrollo de, al menos, un tipo de malignidad. En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo concertado para determinar cuáles de estos genes están alterados, ya sea por mutación puntual, translocación, eliminación o duplicación, en varios tipos de tumores. Este esfuerzo se ha apoyado en los recientes avances en la secuenciación del DNA, que permiten a los investigadores determinar las secuencias de nucleótidos de regiones específicas del genoma de una manera más rápida y económica que antes.

Se esperaba que la mayoría de los tipos de cáncer se caracterizaran por alteraciones en un número relativamente pequeño de genes. Se sabe desde hace bastante tiempo, por ejemplo, que un gran porcentaje de melanomas exhiben genes *BRAF* mutantes y un gran porcentaje de cánceres colorrectales exhiben genes *APC* mutantes. De manera similar, los diversos tipos de leucemias se caracterizan por translocaciones específicas, como lo ejemplifica la translocación de *BCR-ABL* en CML (véase sección 16.16). En todos estos casos, estas mutaciones ocurren en una etapa temprana en el desarrollo del tumor y se piensa que son de gran impor-

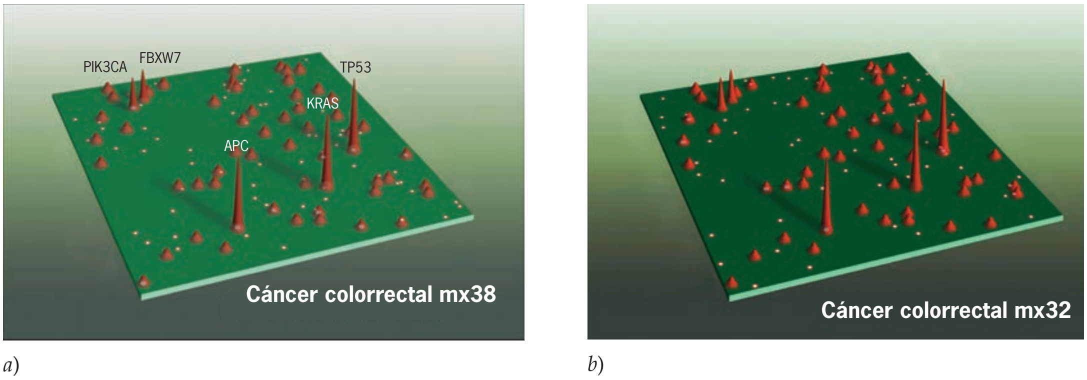



**FIGURA 16-19** Paisaje genómico de los cánceres colorrectales. Estos mapas bidimensionales representan los genes que mutan con más frecuencia en tumores colorrectales. Cada proyección rojiza representa un gen diferente. Los cinco genes que están mutados en una gran proporción de tumores se representan por las proyecciones más altas, denominadas "montañas", y reciben un nombre específico. Los 50 o más genes que se mutan a una frecuencia mucho más baja constituyen las "colinas" más pequeñas del paisaje genómico. En esta ilustración se representan los paisajes mutacionales de dos tumores individuales (identificados como Mx38 y Mx32), para representar el grado en que los tumores colorrectales de diferentes pacientes comparten genes mutados en común. Los genes que se encontraron mutados somáticamente en cada uno de estos tumores individuales están indicados por los círculos blancos. Es evidente que se comparten muy pocas mutaciones entre los tumores de estos dos individuos. En el ejemplo que se muestra aquí, sólo los genes *APC* y *TP53* están mutados en ambos casos de la enfermedad. (*Nota:* las posiciones de los genes en este paisaje bidimensional están ordenadas por puntos desde un extremo del cromosoma 1 en la parte inferior izquierda del paisaje, y derivan a través de cada uno de los autosomas en orden ascendente, hasta llegar finalmente a los puntos del cromosoma X en el borde derecho del paisaje.

FUENTE: *a*, *b*) Tomada de Laura D Wood, *et al*. Cortesía de Bert Vogelstein. *Science* 2007;318:1113; © 2007. Reimpreso con autorización de AAAS.

tancia para convertir la célula hacia un estado maligno final. Sin embargo, los resultados de los estudios iniciales de los genomas de cáncer sugieren que los mismos tipos de tumores tomados de diferentes pacientes poseen combinaciones bastante divergentes de genes aberrantes.

Esta observación probablemente refleje las diferentes rutas que los tumores individuales pueden tomar para escapar de las protecciones antitumorales normales de la célula. Estos hallazgos se pueden expresar como se muestra en la figura **16-19**, donde los genes mutados identificados en un gran número de tipos de cánceres colorrectales se muestran como picos dentro de un "paisaje mutacional" bidimensional. La altura de los distintos picos refleja la frecuencia con la que ese gen en particular está mutado en este tipo específico de cáncer. Es evidente, a partir de este tipo de visualización, que una pequeña cantidad de genes están mutados en una gran proporción de tumores; estos pueden ser considerados como "montañas" en el paisaje. En su mayor parte, estos son los oncogenes en los cuales los investigadores del cáncer se han centrado a lo largo de los años. Cada tipo de cáncer tiene su propio complemento característico de genes mutados con frecuencia. En el caso del cáncer colorrectal humano, los tres genes que mutan con más frecuencia se muestran en la figura 16-19, a saber, *APC*, *KRAS* y *TP53*, tienden a mutarse en diferentes etapas en la progresión de este tipo de cáncer (obsérvese **FIGURA 16-20**). Las mutaciones en ambas copias del gen *APC* se encuentran en más de 60% de los adenomas benignos más pequeños del colon, lo que sugiere que las mutaciones en este gen a menudo representan un primer paso en la formación de cánceres de colon. Los adenomas más grandes, así como las masas celulares en las primeras etapas de la malignidad, tienden a contener mutaciones en uno de los oncogenes *RAS*, a saber, *KRAS*. En contraste, el gen *TP53* tiende a mutar (o volverse epigenéticamente silenciado) sólo en etapas posteriores a lo largo del camino, cuando el tumor es claramente maligno. Las células que muestran inestabilidad cromosómica, que se refleja en cariotipos cada vez más anormales, sólo aparecen después de las mutaciones en *KRAS*.

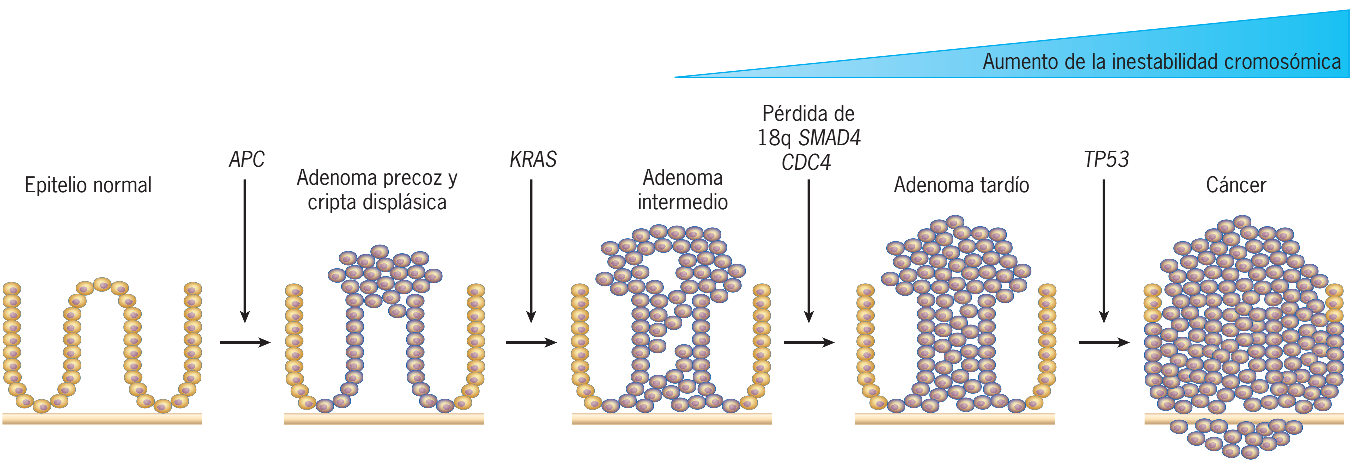



**FIGURA 16-20 Modelo que describe la secuencia de las mutaciones genéticas que ocurren a menudo durante el desarrollo del cáncer de colon.** Los cambios histológicos que ocurren en las distintas etapas del desarrollo de este cáncer se indican en los dibujos. Los adenomas son crecimientos benignos (pólipos) que, si no se extirpan durante una colonoscopia, tienen el potencial de desarrollarse a lo largo de los años en tumores malignos. Los genes indicados en cada paso en el desarrollo de estos tumores son algunos de los principales impulsores de la oncogénesis colorrectal, como se explica en el texto. Alrededor de 70% de los cánceres de colon exhiben inestabilidad cromosómica y aneuploidía.

FUENTE: A Walther, *et al*. Nature.com; *Nature Revs Cancer* 2009;9:491, Figura 1. *Nature Reviews Cancer* by Nature Publishing Group. Reproducido con la autorización de Nature Publishing Group reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

Las figuras 16-19 y 16-20 ilustran cómo un pequeño número de genes tiende a mutarse con una frecuencia relativamente alta en el cáncer colorrectal. Sin embargo, un número sorprendentemente grande de genes se mutan a una frecuencia más baja (menos de 5% de los casos); estos se han descrito como "colinas". En la figura 16-19 hay aproximadamente 50 genes diferentes que representan las colinas en el paisaje mutacional de los cánceres colorrectales. Si bien podemos suponer que los genes que se mutan con una alta frecuencia (las montañas) son factores importantes para conducir a las células a la malignidad, un importante debate se centra en los roles de los genes que se mutan a una frecuencia más baja (las colinas). Muchos de los genes representados por las colinas, casi con seguridad, tienen un papel causal en la determinación de las propiedades del fenotipo maligno, incluso si proporcionan al tumor sólo una pequeña ventaja selectiva. Las mutaciones que causan o que contribuyen al fenotipo maligno se describen como *conductores*. Otros genes que constituyen una colina pueden representar, simplemente, "pasajeros", es decir, genes que tienden a mutarse por alguna razón, pero no tienen efecto sobre el fenotipo de la célula cancerosa. Puede ser un desafío abrumador determinar cuáles de estos genes son conductores y cuáles son únicamente pasajeros. Además de los genes de las "montañas y colinas", existen otros genes que aparecen en un estado mutante con una frecuencia muy baja en una población de tumores. Un examen detallado de la ubicación de los círculos blancos en los dos paisajes en la figura 16-19*a*) y *b*) indica que sólo los dos individuos comparten una pequeña cantidad de genes mutados en estos cánceres. Por tanto, en cierto sentido, cada persona sufre su propio tipo de enfermedad. Incluso dentro de un paciente dado, las lesiones metastásicas que se han diseminado a diferentes regiones del cuerpo pueden tener complementos notablemente diferentes de genes mutados. Es posible que estas diferencias reflejen los distintos cambios genéticos que ocurren durante el crecimiento de cada tumor secundario.

Por este y muchos otros estudios sobre otros tipos de cáncer es evidente que el panorama mutacional del genoma del cáncer es complejo. Sin embargo, numerosas investigaciones genómicas han demostrado que la mayoría de estos grandes números de genes codifica proteínas que participan como componentes de un número relativamente pequeño de vías. Un estudio del panorama mutacional de más de 3 000 tumores de 12 tipos principales de cáncer identificó 127 mutaciones genéticas que impactaron un conjunto central de 20 vías o procesos celulares (véase **FIGURA 16-21**). Aunque hay una variación significativa entre los diferentes cánceres estudiados, la mayoría de los tumores exhibió mutaciones que afectaron dos vías principales: p53 y PI3K. Por tanto, como se discutió en otra parte de este capítulo, se puede pensar en el cáncer no simplemente como una enfermedad de genes anormales, sino como una enfermedad de las vías celulares anormales. Las mutaciones en cualquiera de varios genes interrumpen la misma vía y, por tanto, tienen las mismas consecuencias para las células. Por ejemplo, la ruta de PI3K en el cáncer de mama puede activarse por mutaciones en la subunidad catalítica de PI3K (*PIK3CA*), por amplificación del receptor del factor de crecimiento *HER2*, mutaciones en el responsable de PI3K, *PKB* (*AKTI*), o por pérdida del antagonista de PI3K, *PTEN*. En la figura 16-18 se indican algunas de las vías más prominentes que tienden a eliminar las regulaciones en distintos tipos de cáncer. Mirar al cáncer como una enfermedad de "vía", en lugar de una enfermedad "genética", genera más optimismo entre los desarrolladores de medicamentos, porque sugiere que interrumpir (o restaurar) cualquiera de los pasos clave en una sola vía esencial puede ser suficiente para descarrilar las células malignas y conducir a la regresión del tumor.

Antes de abandonar el tema de la genética del cáncer, se debe tener en cuenta que, aunque algunos cánceres pueden ser el resultado de la progresión gradual en múltiples etapas de mutaciones puntuales individuales, como se describió antes, otros cánceres pueden no seguir este mismo camino. Se cree que algunas formas de carcinogénesis se inician por eventos catastróficos que conducen a la inestabilidad genética en un número relativamente pequeño de divisiones celulares. Por ejemplo, las mutaciones en un gen involucrado en la replicación del DNA o la reparación del DNA, como ocurre en los casos de cáncer colorrectal, podrían generar con rapidez células con anormalidades genéticas generalizadas. La formación de tumores también puede iniciarse cuando las células experimentan una división celular anormal y poseen números aberrantes de cromosomas. La mejor manera de determinar cómo se originó un cáncer es analizar el estado del genoma en las células en etapas muy tempranas de la formación de tumores. Desafortunadamente, es casi imposible identificar tumores cuando están compuestos por un pequeño número de células. En el momento en que se detectan los tumores, las células ya muestran un alto grado de trastorno genético, lo que dificulta determinar si estas alteraciones genéticas son una causa o un efecto del crecimiento del tumor.

**REPASO**

1. ¿Qué significa el término *paisaje mutacional* en referencia al genoma de una célula cancerosa? ¿Qué representan las montañas y las colinas?

## 16.13 Análisis de la expresión génica

La tecnología para analizar la expresión de genes utilizando micromatrices de DNA (o chips de DNA) se describió en detalle en la sección 12.10. En resumen, se prepara un portaobjetos de vidrio que puede contener desde un puñado hasta miles de manchas de DNA, cada mancha contiene el DNA correspondiente a un solo gen conocido. Cualquier conjunto particular de genes, como aquellos que se cree que están involucrados en el crecimiento y la división, o aquellos que se cree que están implicados en el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos o algún otro tipo de célula, pueden incluirse dentro de la micromatriz. Una vez preparada, la micromatriz se incuba con cDNA marcados con fluorescencia sintetizados a partir de los mRNA de una población particular de células, como la de una masa tumoral que se extrajo durante la cirugía o la de células sanguíneas cancerosas de un paciente con leucemia. Los cDNA marcados con fluorescencia se hibridan con manchas de DNA complementario plantadas en el portaobjetos, y el análisis posterior del patrón de fluorescencia indica a los investigadores qué mRNA están presentes dentro de las células tumorales y su abundancia relativa dentro de la población de mRNA.

Los estudios con micromatrices de DNA demostraron que los perfiles de expresión genética pueden proporcionar información invaluable sobre las propiedades de un tumor. Se ha encontrado, por ejemplo, que 1) la progresión de un tumor está correlacionada con un cambio en la expresión de genes particulares, 2) ciertos cánceres que parecen ser similares, según los criterios convencionales, pueden dividirse en subtipos que tienen diferentes características clínicas sobre la base de sus perfiles de expresión genética, 3) el perfil de expresión genética del tumor de un paciente individual puede revelar cuán agresivo (es decir, cuán letal) es probable que sea el cáncer y 4) el perfil de la expresión genética del tumor de un paciente individual puede proporcionar pistas sobre qué tipo de estrategia terapéutica es más probable que induzca la regresión del tumor. Algunos de estos temas pueden analizarse con más detalle.

La **FIGURA 16-22** describe los niveles a los que se encontró que 50 genes diferentes se transcribían en dos tipos diferentes de leucemia, la leucemia linfoblástica aguda (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) y la leucemia mieloide aguda (AML, *acute myeloid leukemia*). Los genes utilizados en esta figura, que se nombran en

| Proceso | BLCA | BRCA | COAD/READ | GBM | HNSC | KIRC | AML | LUAD | LUSC | OV | UCEC | Pan–Cáncer | Gen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Factor de transcripción/regulador | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 52.3 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.9 | 6.9 | *VHL* |
| | 1.0 | 10.6 | 1.0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 2.6 | 2.9 | 0.3 | 0.4 | 0.0 | *GATA3* |
| | 2.0 | 0.7 | 3.1 | 0.7 | 1.3 | 1.2 | 0.5 | 14.9 | 6.3 | 1.0 | 3.9 | 2.6 | *TSHZ3* |
| | 17.4 | 0.8 | 2.1 | 0.3 | 8.0 | 1.4 | 0.0 | 0.9 | 4.6 | 0.3 | 5.2 | 2.5 | *ER300* |
| | 2.0 | 2.4 | 1.6 | 0.0 | 3.3 | 0.5 | 0.5 | 1.3 | 0.0 | 0.3 | 16.5 | 2.4 | *CTCF* |
| | 2.0 | 1.1 | 1.6 | 1.4 | 2.3 | 1.2 | 0.0 | 4.0 | 6.9 | 1.6 | 8.7 | 2.3 | *TAF1* |
| | 4.1 | 0.9 | 3.1 | 2.4 | 1.3 | 0.7 | 0.0 | 6.6 | 3.5 | 1.0 | 1.7 | 1.8 | *TSHZ2* |
| | 1.0 | 3.3 | 1.0 | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 9.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 1.6 | *RUNX1* |
| | 5.1 | 0.5 | 1.0 | 1.4 | 1.7 | 1.0 | 0.0 | 3.5 | 4.6 | 0.6 | 3.0 | 1.5 | *MECOM* |
| | 3.1 | 2.4 | 1.0 | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 4.4 | 2.9 | 1.0 | 1.3 | 1.4 | *TBX3* |
| | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 0.0 | 1.8 | 2.9 | 0.6 | 5.2 | 1.1 | *SIN3A* |
| | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 0.7 | 0.0 | 0.7 | 6.0 | 3.5 | 2.3 | 0.0 | 0.4 | 1.0 | *WT1* |
| | 2.0 | 0.5 | 2.6 | 0.0 | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 1.8 | 1.2 | 0.6 | 1.3 | 0.8 | *EIF4A2* |
| | 4.1 | 1.7 | 0.0 | 1.0 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | *FOXA1* |
| | 3.1 | 0.4 | 0.0 | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 3.0 | 0.9 | 1.2 | 0.3 | 1.3 | 0.8 | *PHF6* |
| | 1.0 | 2.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 1.0 | 0.4 | 0.6 | 0.0 | 0.4 | 0.7 | *CBFB* |
| | 0.0 | 0.1 | 4.2 | 1.0 | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 1.3 | 0.6 | 0.0 | 0.4 | 0.7 | *SOX9* |
| | 8.2 | 0.1 | 3.6 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | *ELF3* |
| | 2.0 | 0.9 | 0.0 | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 1.7 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | *VEZF1* |
| | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 6.5 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | *CEBPA* |
| | 1.0 | 0.0 | 0.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 4.8 | 0.5 | *FOXA2* |
| Modificador de histonas | 24.5 | 6.4 | 2.6 | 3.1 | 7.3 | 3.6 | 0.5 | 18.4 | 15.5 | 1.9 | 5.2 | 6.6 | *MLL3* |
| | 25.2 | 1.6 | 1.6 | 1.7 | 17.9 | 3.1 | 0.5 | 8.8 | 20.1 | 0.6 | 8.3 | 5.9 | *MLL2* |
| | 27.6 | 2.0 | 5.7 | 0.7 | 3.0 | 2.9 | 0.5 | 6.1 | 6.3 | 1.0 | 30.0 | 5.4 | *ARID1A* |
| | 6.1 | 0.4 | 0.0 | 0.7 | 2.3 | | 0.0 | 1.8 | 3.5 | 0.3 | 2.6 | 5.4 | *PBRM1* |
| | 6.1 | 1.2 | 2.6 | 1.7 | 2.3 | 11.5 | 0.5 | 7.9 | 2.9 | 1.9 | 2.6 | 3.6 | *SETD2* |
| | 6.1 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 10.6 | 1.0 | 0.0 | 3.1 | 5.2 | 0.6 | 5.7 | 2.4 | *NSD1* |
| | 2.0 | 0.4 | 1.6 | 1.4 | 3.0 | 1.4 | 1.0 | 12.7 | 5.2 | 0.0 | 2.2 | 2.2 | *SETBP1* |
| | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 1.0 | 6.5 | 0.0 | 4.8 | 2.9 | 1.9 | 2.2 | 2.0 | *KDM5C* |
| | 26.5 | 1.1 | 0.0 | 1.0 | 2.7 | 1.0 | 1.5 | 0.9 | 4.0 | 0.0 | 0.9 | 2.0 | *KDM6A* |
| | 7.1 | 0.7 | 2.1 | 2.1 | 2.7 | 1.0 | 0.0 | 1.8 | 4.0 | 0.3 | 8.3 | 2.0 | *MLL4* |
| | 3.1 | 0.4 | 0.0 | 0.3 | 3.3 | 0.7 | 0.0 | 2.2 | 1.7 | 0.6 | 9.6 | 1.6 | *ARID5B* |
| | 3.1 | 0.4 | 1.6 | 0.0 | 3.0 | 1.0 | 2.5 | 1.3 | 5.2 | 0.0 | 0.9 | 1.3 | *ASXL1* |
| | 1.0 | 0.1 | 0.0 | 1.0 | 0.3 | 0.7 | 1.5 | 2.2 | 2.3 | 0.0 | 1.7 | 0.8 | *EZH2* |
| Integridad del genoma | | | | | | 2.2 | 7.5 | | | | | 42.0 | *TP53* |
| | 11.2 | 2.1 | 5.7 | 1.4 | 2.7 | 2.9 | 0.0 | 7.9 | 4.0 | 1.3 | 6.5 | 3.3 | *ATM* |
| | 8.2 | 1.2 | 1.0 | 5.5 | 4.3 | 1.9 | 0.0 | 6.1 | 5.8 | 0.6 | 3.0 | 2.8 | *ATRX* |
| | 6.1 | 1.7 | 1.6 | 1.4 | 3.7 | 1.9 | 0.0 | 5.7 | 5.8 | 3.2 | 4.4 | 2.7 | *BRCA2* |
| | 4.1 | 0.8 | 2.1 | 1.4 | 5.3 | 1.2 | 0.0 | 5.7 | 4.0 | 0.6 | 7.0 | 2.4 | *ATR* |
| | 10.2 | 0.9 | 1.0 | 4.1 | 0.7 | 1.7 | 3.0 | 2.6 | 3.5 | 1.0 | 3.9 | 2.2 | *STAG2* |
| | 4.1 | 0.3 | 0.0 | 0.7 | 1.0 | 10.0 | 0.0 | 1.3 | 0.6 | 0.6 | 2.2 | 2.0 | *BAP1* |
| | 4.1 | 1.6 | 0.0 | 1.0 | 2.7 | 1.0 | 0.0 | 3.5 | 5.2 | 3.5 | 0.9 | 1.9 | *BRCA1* |
| | 3.1 | 0.8 | 1.6 | 1.7 | 1.0 | 0.5 | 3.5 | 1.3 | 0.6 | 1.3 | 4.4 | 1.5 | *SMC1A* |
| | 1.0 | 0.4 | 0.0 | 1.4 | 1.7 | 1.2 | 3.5 | 2.6 | 2.3 | 0.3 | 0.4 | 1.2 | *SMC3* |
| | 2.0 | 0.4 | 0.0 | 1.7 | 2.3 | 0.7 | 0.0 | 0.9 | 1.2 | 0.3 | 1.3 | 0.9 | *CHEK2* |
| | 2.0 | 0.5 | 1.0 | 0.3 | 1.0 | 0.0 | 2.5 | 2.6 | 1.2 | 0.3 | 0.9 | 0.9 | *RAD21* |
| | 12.2 | 0.1 | 0.5 | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 0.3 | 0.4 | 0.7 | *ERCC2* |
| Señalización RTK | 1.0 | 0.7 | 1.6 | 26.6 | 4.7 | 1.7 | 1.0 | 11.4 | 2.9 | 1.9 | 1.3 | 4.6 | *EGFR* |
| | 2.0 | 0.4 | 0.0 | 1.7 | 0.7 | 0.5 | 26.5 | 4.0 | 4.0 | 1.0 | 0.9 | 2.7 | *FLT3* |
| | 1.0 | 0.5 | 3.1 | 1.0 | 3.7 | 0.5 | 0.5 | 8.8 | 6.3 | 1.0 | 2.2 | 2.1 | *EPHA3* |
| | 2.0 | 0.8 | 3.6 | 0.3 | 4.3 | 1.4 | 0.0 | 7.5 | 5.2 | 0.0 | 2.6 | 2.1 | *ERBB4* |
| | 6.1 | 0.4 | 1.0 | 3.8 | 1.0 | 1.4 | 0.5 | 6.6 | 4.0 | 1.0 | 1.3 | 1.9 | *PDGFRA* |
| | 3.1 | 0.4 | 0.0 | 1.4 | 1.3 | 1.2 | 0.0 | 9.7 | 3.5 | 0.3 | 1.7 | 1.6 | *EPHB6* |
| | 2.0 | 0.9 | 0.0 | 0.3 | 0.7 | 0.2 | 0.0 | 3.1 | 2.3 | 0.0 | 10.4 | 1.5 | *FGFR2* |
| | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.7 | 4.0 | 1.8 | 3.5 | 1.9 | 2.2 | 1.4 | *KIT* |
| | 8.2 | 0.1 | 0.5 | 1.4 | 1.7 | 1.4 | 0.0 | 0.4 | 2.3 | 0.3 | 0.4 | 1.0 | *FGFR3* |
| Ciclo celular | 4.1 | 0.0 | 0.5 | 0.7 | 21.3 | 1.0 | 0.0 | 6.6 | 14.9 | 0.0 | 0.4 | 3.6 | *CDKN2A* |
| | 14.3 | 1.8 | 0.5 | 8.3 | 3.0 | 0.2 | 0.0 | 5.3 | 6.9 | 1.9 | 3.9 | 3.2 | *RB1* |
| | 4.1 | 0.9 | 1.6 | 0.3 | 1.7 | 1.4 | 0.0 | 3.1 | 0.6 | 2.9 | 2.2 | 1.5 | *CDK12* |
| | 2.0 | 0.9 | 1.0 | 0.3 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 0.3 | 0.9 | 0.7 | *CDKN1B* |
| | 2.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 0.6 | 0.0 | 5.2 | 0.6 | *CCND1* |
| | 12.2 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.4 | 1.2 | 0.3 | 0.0 | 0.6 | *CDKN1A* |
| | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.6 | 0.0 | 0.2 | *CDKN2C* |

| Proceso | BLCA | BRCA | COAD/READ | GBM | HNSC | KIRC | AML | LUAD | LUSC | OV | UCEC | Pan–Cáncer | Gen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Señalización MAPK | 0.0 | 0.8 | 45.1 | 0.7 | 0.3 | 0.2 | 4.0 | 26.3 | 1.2 | 0.6 | 20.0 | 6.7 | *KRAS* |
| | 7.1 | 2.5 | 1.0 | 11.0 | 2.7 | 1.7 | 1.0 | 11.8 | 10.3 | 3.8 | 3.5 | 4.4 | *NF1* |
| | 3.1 | 7.2 | 0.0 | 2.1 | 1.0 | 1.2 | 0.0 | 1.8 | 1.7 | 0.3 | 3.5 | 2.7 | *MAP3K1* |
| | 2.0 | 0.4 | 3.6 | 2.1 | 1.0 | 0.2 | 0.0 | 6.6 | 4.6 | 0.6 | 0.9 | 1.5 | *BRAF* |
| | 2.0 | 0.1 | 8.8 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 7.5 | 1.8 | 0.6 | 0.6 | 2.6 | 1.5 | *NRAS* |
| | 0.0 | 4.1 | 2.6 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 0.6 | 0.3 | 1.3 | 1.4 | *MAP2K4* |
| | 2.0 | 0.3 | 2.1 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 0.0 | 1.8 | 1.2 | 0.3 | 0.4 | 0.7 | *MAPKBIP1* |
| Señalización PI(3)K | 17.4 | 33.6 | 17.6 | 11.0 | 20.6 | 2.9 | 0.0 | 4.4 | 14.9 | 0.6 | 52.2 | 17.8 | *PIK3CA* |
| | 3.1 | 3.8 | 1.0 | 30.7 | 1.3 | 4.3 | 0.0 | 2.2 | 8.1 | 0.6 | 63.5 | 9.7 | *PTEN* |
| | 1.0 | 2.5 | 2.1 | 11.4 | 1.7 | 0.5 | 0.0 | 1.3 | 0.6 | 0.6 | 30.9 | 4.4 | *PIK3R1* |
| | 2.0 | 1.2 | 0.0 | 0.3 | 2.0 | 0.5 | 0.5 | 11.4 | 5.8 | 1.0 | 0.4 | 1.9 | *TLR4* |
| | 2.0 | 0.4 | 0.5 | 2.4 | 2.7 | 0.7 | 0.0 | 5.3 | 7.5 | 1.0 | 1.3 | 1.7 | *PIK3CG* |
| | 0.0 | 2.5 | 0.0 | 0.3 | 0.7 | 0.5 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 1.3 | 0.9 | *AKT1* |
| Señalización TGF-β | 2.0 | 0.4 | 9.8 | 0.3 | 2.0 | 0.5 | 0.0 | 3.1 | 2.9 | 0.0 | 0.0 | 1.4 | *SMAD4* |
| | 3.1 | 0.4 | 2.6 | 0.7 | 3.0 | 0.2 | 0.0 | 0.9 | 1.7 | 1.0 | 1.3 | 1.1 | *TGFBR2* |
| | 0.0 | 0.7 | 3.6 | 0.0 | 1.3 | 1.0 | 0.0 | 2.2 | 1.2 | 0.3 | 1.7 | 1.0 | *ACVR1B* |
| | 1.0 | 0.5 | 5.7 | 0.0 | 1.0 | 0.5 | 0.0 | 0.9 | 1.2 | 0.0 | 1.3 | 0.9 | *SMAD2* |
| | 1.0 | 0.5 | 2.6 | 0.0 | 0.7 | 0.2 | 0.0 | 0.9 | 1.2 | 0.0 | 0.4 | 0.6 | *ACVR2A* |
| Señalización Wnt/β-catenina | 4.1 | 0.5 | 81.9 | 0.3 | 4.0 | 1.4 | 0.0 | 9.2 | 4.0 | 2.2 | 5.7 | 7.3 | *APC* |
| | 2.0 | 0.1 | 4.7 | 0.3 | 0.7 | 0.2 | 0.0 | 3.5 | 1.7 | 0.6 | 28.3 | 2.9 | *CTNNB1* |
| | 3.1 | 0.1 | 3.6 | 0.3 | 1.7 | 0.2 | 0.0 | 0.9 | 0.6 | 0.3 | 2.6 | 0.9 | *AXIN2* |
| | 2.0 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 0.7 | 0.0 | 2.2 | 1.2 | 0.3 | 1.3 | 0.8 | *TBL1XR1* |
| | 0.0 | 0.0 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 3.0 | 0.3 | *SOX17* |
| Histona | 1.0 | 0.4 | 1.0 | 0.7 | 1.3 | 0.2 | 0.0 | 0.4 | 0.6 | 1.3 | 0.0 | 0.6 | *HIST1H1C* |
| | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 1.2 | 0.0 | 0.9 | 0.4 | *H3F3C* |
| | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.3 | 2.6 | 0.4 | *HIST1H2BD* |
| Proteólisis | 9.2 | 0.8 | 11.4 | 0.3 | 5.0 | 0.2 | 0.0 | 1.3 | 5.2 | 1.0 | 11.7 | 3.0 | *FBXW7* |
| | 3.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 0.5 | 0.0 | 17.1 | 12.1 | 0.3 | 1.3 | 2.6 | *KEAP1* |
| | 1.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.6 | 0.3 | 6.5 | 0.7 | *SPOP* |
| Empalme | 4.1 | 1.8 | 1.0 | 0.7 | 0.7 | 1.0 | 0.5 | 2.2 | 2.3 | 0.0 | 2.2 | 1.3 | *SF3B1* |
| | 1.0 | 0.3 | 0.5 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 4.0 | 2.6 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 0.8 | *U2AF1* |
| | 1.0 | 0.0 | 2.6 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 0.3 | *PCBP1* |
| Señalización HIPPO | 5.1 | 7.0 | 0.5 | 0.3 | 1.3 | 0.5 | 0.0 | 1.3 | 1.7 | 0.3 | 3.0 | 2.5 | *CDH1* |
| | 2.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 6.0 | 0.5 | 0.0 | 0.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | *AJUBA* |
| Metilación de DNA | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 0.0 | 1.7 | 1.2 | 25.5 | 4.0 | 4.0 | 1.0 | 1.3 | 2.8 | *DNMT3A* |
| | 3.1 | 0.4 | 0.0 | 0.7 | 0.3 | 1.9 | 8.5 | 3.1 | 2.3 | 0.0 | 2.2 | 1.6 | *TET2* |
| Metabolismo | 3.1 | 0.3 | 0.0 | 5.2 | 0.3 | 0.5 | 9.5 | 0.9 | 1.2 | 0.0 | 0.9 | 1.5 | *IDH1* |
| | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.8 | *IDH2* |
| NFE2L | 9.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 5.3 | 1.2 | 0.0 | 2.2 | 14.9 | 0.0 | 5.2 | 2.3 | *NFE2L2* |
| | 3.1 | 0.8 | 0.0 | 0.3 | 1.3 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 2.3 | 0.3 | 1.7 | 0.8 | *NFE2L3* |
| Proteína fosfatasa | 1.0 | 0.1 | 1.6 | 0.0 | 1.3 | 1.2 | 0.0 | 1.3 | 4.6 | 1.3 | 8.7 | 1.5 | *PPP2R1A* |
| | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 1.7 | 0.3 | 0.2 | 4.5 | 2.6 | 1.7 | 0.3 | 0.9 | 1.0 | *PTPN11* |
| Ribosoma | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.7 | 0.5 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 10.9 | 1.0 | *RPL22* |
| | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 2.8 | 0.0 | 1.4 | 0.0 | 0.4 | 1.2 | 0.0 | 0.9 | 0.7 | *RPL5* |
| Señalización TOR | 2.0 | 1.4 | 3.6 | 1.4 | 1.3 | 6.0 | 0.0 | 7.5 | 4.6 | 1.9 | 5.2 | 3.0 | *MTOR* |
| | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | 8.8 | 1.7 | 0.0 | 0.4 | 0.9 | *STK11* |
| Otro | 5.1 | 1.4 | 2.1 | 1.0 | 7.3 | 1.4 | 0.0 | 21.5 | 19.0 | 1.3 | 5.2 | 4.6 | *NAV3* |
| | 5.1 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 19.3 | 1.0 | 0.5 | 3.1 | 8.1 | 0.6 | 1.7 | 3.1 | *NOTCH1* |
| | 5.1 | 0.7 | 2.6 | 1.0 | 5.0 | 1.4 | 0.0 | 6.6 | 11.5 | 2.9 | 3.5 | 2.8 | *LRRK2* |
| | 15.3 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 6.3 | 1.9 | 0.0 | 9.7 | 5.8 | 1.0 | 0.0 | 2.7 | *MALAT1* |
| | 5.1 | 0.9 | 0.5 | 0.7 | 3.7 | 1.2 | 0.5 | 4.0 | 5.8 | 1.6 | 10.0 | 2.5 | *ARHGAP35* |
| | 7.1 | 0.8 | 0.5 | 1.0 | 4.3 | 1.2 | 0.0 | 5.7 | 9.2 | 1.0 | 3.9 | 2.4 | *POLQ* |
| | 8.2 | 3.9 | 0.5 | 0.7 | 3.3 | 0.7 | 0.0 | 2.6 | 3.5 | 0.3 | 1.3 | 2.2 | *NCOR1* |
| | 3.1 | 1.2 | 0.0 | 0.7 | 4.3 | 1.0 | 0.5 | 5.3 | 4.6 | 0.3 | 6.5 | 2.1 | *USP9X* |
| | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 27.0 | 0.9 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 1.8 | *NPM1* |
| | 1.0 | 0.5 | 0.0 | 0.3 | 2.7 | 0.2 | 0.0 | 10.5 | 5.8 | 0.6 | 1.3 | 1.7 | *HGF* |
| | 2.0 | 0.3 | 0.0 | 2.8 | 2.7 | 0.7 | 0.0 | 3.1 | 4.0 | 0.3 | 3.0 | 1.4 | *EPPK1* |
| | 1.0 | 0.7 | 2.1 | 0.0 | 2.3 | 0.5 | 0.0 | 1.8 | 3.5 | 0.3 | 3.5 | 1.2 | *AR* |
| | 1.0 | 0.8 | 5.2 | 0.0 | 2.7 | 0.5 | 0.0 | 0.9 | 1.7 | 0.6 | 1.7 | 1.2 | *LIFR* |
| | 5.1 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 1.7 | 1.2 | 0.5 | 0.4 | 1.2 | 0.3 | 1.3 | 0.9 | *PRX* |
| | 2.0 | 0.3 | 0.0 | 0.3 | 1.0 | 0.5 | 0.0 | 5.3 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.7 | *CRIPAK* |
| | 1.0 | 0.3 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.4 | 1.2 | 0.0 | 0.4 | 0.3 | *EGR3* |
| | 0.0 | 0.1 | 0.5 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.0 | 0.9 | 0.2 | *B4GALT3* |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | *MIR142* |

**FIGURA 16-21** Un pequeño número de vías de señalización se altera comúnmente en los cánceres. Esta tabla muestra con que frecuencia ciertos genes se mutan en un grupo diverso de 3 281 muestras de tumores que representan 12 tipos diferentes de cáncer. Se identificaron 127 genes mutados significativos, que se clasificaron en uno de los 20 principales procesos celulares. Los 12 cánceres investigados fueron adenocarcinoma de mama (BRCA, *breast adenocarcinoma*), adenocarcinoma de pulmón (LUAD, *lung adenocarcinoma*), carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC, *lung squamous cell carcinoma*), carcinoma endometrial del cuerpo uterino (UCEC, *uterine corpus endometrial carcinoma*), glioblastoma multiforme (GBM, *glioblastoma multiforme*), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSC, *head and neck squamous cell carcinoma*), colon y carcinoma rectal (COAD, READ, *colon and rectal carcinoma*), carcinoma urotelial de vejiga (BLCA, *bladder urothelial carcinoma*), carcinoma renal de células claras en riñón (KIRC, *kidney renal clear cell carcinoma*), carcinoma ovárico seroso (OV, *ovarian serous carcinoma*) y leucemia mieloide aguda (LAML, *acute myeloid leukaemia*).

FUENTE: Tomada de C Kandoth, *et al*. *Nature* 2013;505:333-339.

el lado derecho, representan aquellos cuya transcripción mostró la mayor diferencia entre estos dos tipos de cáncer de células sanguíneas. Cada columna representa los resultados de un solo paciente con ALL o AML, de modo que diferentes columnas permiten comparar las similitudes en la expresión del gen de un paciente a otro. Los niveles de expresión genética se indican desde azul oscuro (nivel más bajo) hasta rojo oscuro (nivel más alto). La mitad superior de la figura identifica los genes que se transcriben a un nivel mucho más alto en las células de ALL, mientras que la mitad inferior identifica los genes que se transcriben a un nivel mucho más alto en las células de AML. Estos estudios ponen de manifiesto que existen muchas diferencias en la expresión genética entre diferentes tipos de tumores. Algunas de estas diferencias pueden correlacionarse con diferencias biológicas y clínicas entre los tumores; uno, por ejemplo, se deriva de una célula mieloide y el otro de una célula linfoide (véase figura 17-6). La mayoría de las diferencias, sin embargo, no se pueden explicar. ¿Por qué, por ejemplo, el gen que codifica la catalasa (el último gen en la lista) se expresa en un nivel bajo en ALL y en un nivel alto en AML? Aunque estos estudios no pueden responder a esta pregunta, pueden proporcionar a los investigadores del cáncer una lista de genes para observar más de cerca como posibles objetivos de los fármacos terapéuticos. Cuanto antes se descubre un cáncer, es más probable que una persona pueda curarse; este es uno de los principios cardinales del tratamiento del cáncer. Sin embargo, un cierto porcentaje de tumores resultará fatal, incluso si se descubre y se extrae en una etapa temprana. Es evidente, por ejemplo, que algunos cánceres de mama en etapa temprana ya contienen células capaces de sembrar la formación de tumores secundarios (metástasis) en lugares distantes, mientras que otros no. Estas diferencias determinan el pronóstico del paciente. En un estudio histórico realizado por un equipo de investigadores holandeses en 2002, se encontró que es probable que el pronóstico de un determinado cáncer de mama se revele en el nivel de expresión de, aproximadamente, 70 genes de los miles que se estudiaron en micromatrices de DNA (véase **FIGURA 16-23**). Este hallazgo ha tenido importantes aplicaciones clínicas para establecer el curso de acción en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Aquellos pacientes con tumores en etapa temprana que muestran un perfil de "mal pronóstico", en función de su

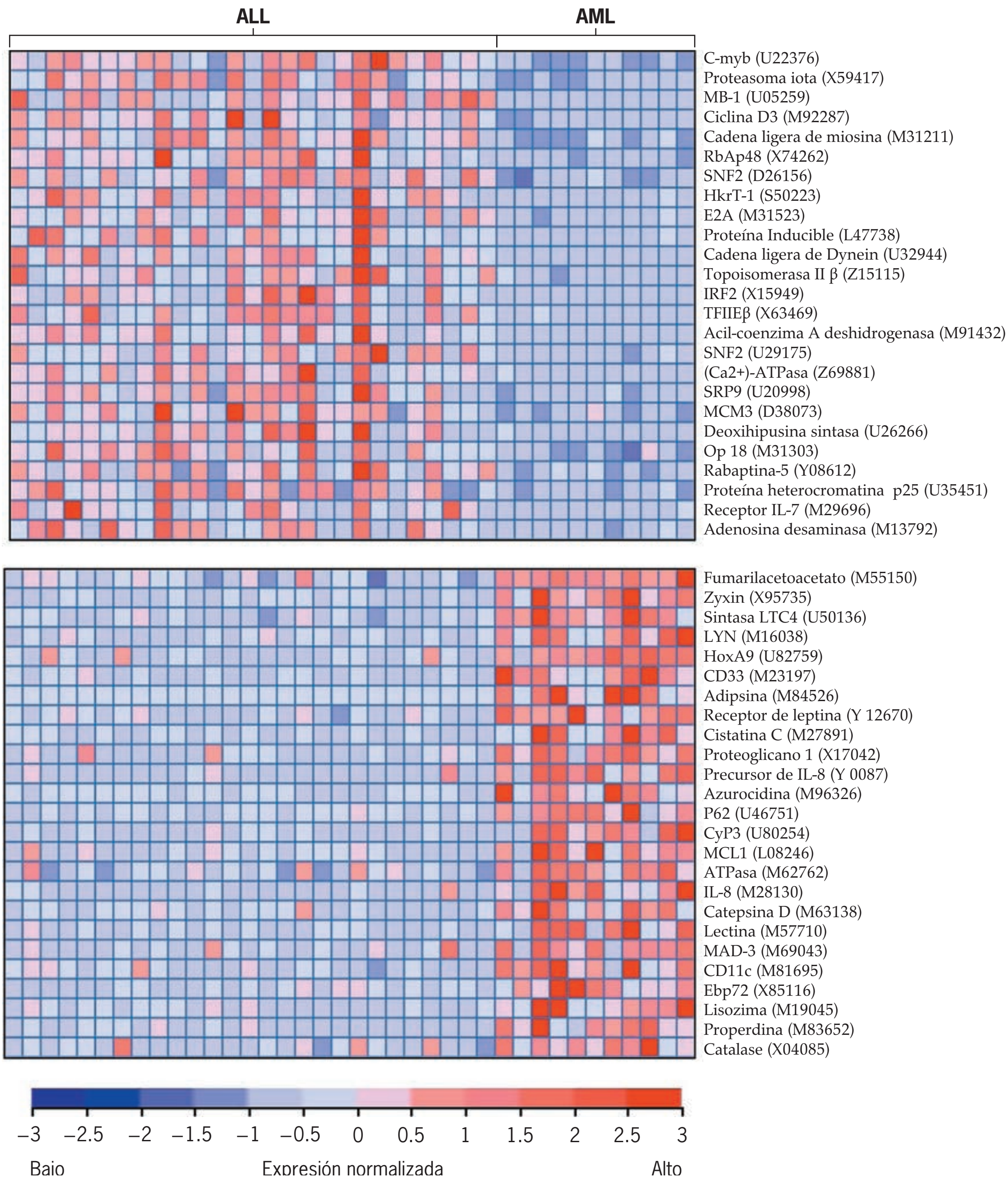



**FIGURA 16-22 Perfil de expresión genética que distingue dos tipos de leucemia.** Cada fila representa el nivel de expresión de un solo gen que se nombra a la derecha de la fila. En total se indican los niveles de expresión de 50 genes diferentes. La clave de color se muestra en la parte inferior de la figura, lo que denota que el nivel más bajo de expresión es en azul oscuro y el más alto en rojo oscuro. Cada columna representa datos de una muestra diferente (paciente). Las columnas de la izquierda muestran los perfiles de expresión de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL), mientras que las columnas de la derecha muestran los perfiles de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) (indicados por los corchetes en la parte superior). Resulta evidente que los genes en el cuadro superior se expresan a un nivel mucho mayor en pacientes con ALL, mientras que los genes en el cuadro inferior se expresan a un nivel mucho mayor en pacientes con AML. (Los genes seleccionados para su inclusión en esta figura se eligieron como ejemplo debido a estas diferencias en la expresión entre las dos enfermedades.)

FUENTE: Tomada de TR Golub, *et al*. *Science* 1999;286:534; Copyright 1999, *Science* por Moses King. Reproducido con autorización de la American Association for the Advancement of Science reutilizado en el formato de libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

patrón de expresión genética (consúltese figura 16-23*a*), pueden ser tratados de manera agresiva con quimioterapia, para ampliar la posibilidad de prevenir la formación de tumores secundarios. Si no se consideran los datos de la expresión genética, es probable que estos individuos no reciban ningún tipo de quimioterapia, porque no existen indicios, según criterios convencionales, de que el tumor se haya diseminado. Por el contrario, los pacientes cuyos tumores muestran un perfil de "buen pronóstico" podrían evitar los fármacos quimioterapéuticos más debilitantes, incluso si sus tumores parecen más avanzados (consúltese figura 16-23*b*). En los últimos años, varias compañías han introducido pruebas de laboratorio (p. ej., MammaPrint y Oncotype DX) para analizar los perfiles de expresión genética de los cánceres de mama individuales, en un intento por ayudar a determinar el mejor curso de tratamiento para estos pacientes. A pesar de que estas pruebas de pronóstico se han generalizado durante varios años, su validez todavía se evalúa en grandes ensayos clínicos. Se espera que los perfiles de expresión genética puedan usarse pronto, para mejorar el diagnóstico y optimizar el tratamiento de pacientes individuales con todo tipo de cáncer.

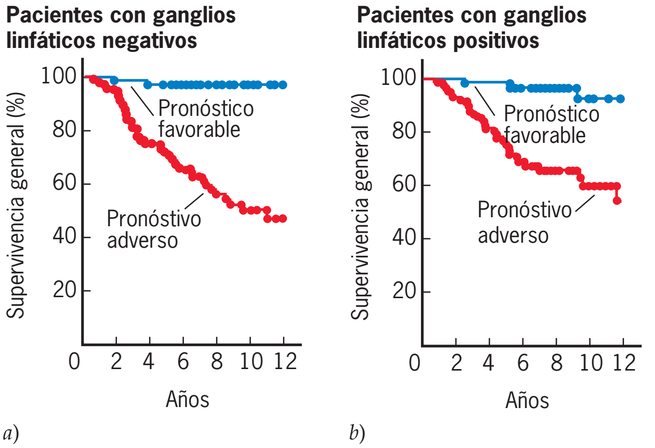





**FIGURA 16-23 Uso de datos de micromatrices de DNA para elegir el tratamiento.** Cada gráfico muestra la tasa de supervivencia a lo largo del tiempo en pacientes con cáncer de mama que tenían una firma de buen pronóstico o una de mal pronóstico basada en el nivel de expresión de 70 genes seleccionados. Los pacientes no demostraron evidencia visible de que el cáncer se hubiera diseminado a los ganglios linfáticos cercanos en el momento de la cirugía. Como se indica en la gráfica: 1) no todos estos pacientes sobreviven y 2) la probabilidad de supervivencia se puede predecir, en gran medida, por los perfiles de expresión genética de sus tumores. Esto permite a los médicos tratar a los pacientes con mal pronóstico de manera más agresiva que aquellos con buen pronóstico. Los pacientes en *b* muestran evidencia visible de propagación de células cancerosas a los ganglios linfáticos cercanos. Como se indica en la gráfica, la probabilidad de supervivencia en este grupo también se puede predecir mediante los datos de expresión genética. En condiciones normales, todos los pacientes de este grupo recibirían un tratamiento muy agresivo, lo que puede no ser necesario para aquellos con buen pronóstico.

FUENTE: Tomada de MJ Van De Vijver, *et al. New England Journal Medicine* 2005;347:2004, Copyright 2002, The New England Journal of Medicine de Massachusetts Medical Society reproducido con autorización de Massachusetts Medical Society, reutilizado en el formato de libro estándar/personalizado (derechos básicos) a través de Copyright Clearance Center.

**REPASO**

1. ¿Cómo se pueden usar las micromatrices de DNA para determinar el tipo de cáncer que sufre un paciente? ¿Cómo podrían utilizarse para optimizar el tratamiento del cáncer?

## 16.14 Estrategias para combatir el cáncer

Resulta dolorosamente evidente que los enfoques convencionales para combatir el cáncer, es decir, la cirugía, la quimioterapia y la radiación, por lo general no logran curar a un paciente de cáncer metastásico, es decir, uno que ya se diseminó desde un tumor primario. Debido a que matan grandes cantidades de células normales, junto con las células cancerosas, la quimioterapia y la radiación tienden a tener efectos secundarios graves, además de tener un valor curativo limitado para la mayoría de los cánceres avanzados. Durante décadas, se ha abrigado la esperanza de que estas estrategias de "fuerza bruta" sean sustituidas por *terapias dirigidas*, basadas en nuestros conocimientos recién formados sobre las bases moleculares de la malignidad. Existen varias maneras en que una terapia puede considerarse "dirigida": puede dirigirse a atacar sólo a las células cancerosas, dejando las células normales intactas; puede dirigirse a una proteína particular cuya desactivación deja a las células cancerosas incapaces de crecer o sobrevivir, o puede dirigirse a las células cancerosas de un paciente en particular, en función de su patrón único de mutaciones somáticas. Aunque la tasa de curación para la mayoría de los tipos de cáncer no ha mejorado en grado significativo en los últimos 50 años, hay razones para creer que se dispondrá de terapias dirigidas eficaces para tratar muchos de los cánceres comunes en un futuro previsible. Este optimismo se basa, sobre todo, en el notable éxito que se ha logrado con una pequeña cantidad de tratamientos específicos que se analizarán en las siguientes páginas. A pesar de que estos éxitos se han diluido entre un número mucho mayor de tratamientos prospectivos fallidos, han demostrado que el concepto de terapia dirigida es sólido. En otras palabras, estos éxitos se pueden considerar como una "prueba de principio", e igualmente importante, brindan a los investigadores y a las compañías de biotecnología el incentivo de invertir tiempo y dinero para continuar la búsqueda de mejores tratamientos contra el cáncer.

Las estrategias contra el cáncer que se discutirán en las siguientes secciones se pueden dividir en tres grupos: 1) las que dependen de anticuerpos o células inmunes para atacar a las células tumorales, 2) las que inhiben la actividad de las proteínas promotoras del cáncer y 3) las que previenen el crecimiento de los vasos sanguíneos que nutren el tumor.

**REPASO**

1. ¿Qué se entiende por estrategias dirigidas para combatir el cáncer y en qué se diferencian de los enfoques más convencionales?

## 16.15 Inmunoterapia

Todos hemos escuchado o leído acerca de personas con cáncer metastásico a las que se les pronosticó sólo unos meses de vida, pero que desafían el pronóstico y años después siguen vivas y libres de cáncer. Los mejores casos estudiados de tales "remisiones espontáneas" fueron registrados a fines del siglo XIX por un médico de Nueva York llamado William Coley. El interés de Coley por el tema comenzó en 1891, cuando se encontró con los registros del hospital de un paciente con un tumor inoperable en el cuello, que experimentó la remisión después de contraer una infección estreptocócica debajo de la piel. Coley localizó al paciente y lo encontró sin rastros del cáncer que una vez había amenazado su vida. Coley pasó los restantes años intentando desarrollar un extracto bacteriano que, cuando se inyectara bajo la piel o en un tumor, estimulara el sistema inmunológico de un paciente para atacar y destruir la malignidad. El trabajo no estuvo exento de éxitos, en particular contra ciertos sarcomas de tejido blando poco comunes. Aunque el uso de la toxina de Coley, como se la llamó más tarde, nunca se aceptó ampliamente, muchos estudios han confirmado observaciones anecdóticas de que el cuerpo tiene la capacidad de destruir un tumor, incluso después de que está bien establecido. En los últimos años, se han seguido dos estrategias de tratamiento amplias que involucran al sistema inmunológico: inmunoterapia pasiva e inmunoterapia activa.

La *inmunoterapia pasiva* es un enfoque que intenta tratar a los pacientes con cáncer mediante la administración de anticuerpos como agentes terapéuticos. Estos anticuerpos reconocen y se unen a proteínas específicas en la superficie de las células tumorales a las cuales se dirigen. Una vez unido, el anticuerpo mata directamente a las células u organiza un ataque a la célula que llevan a cabo otros elementos del sistema inmunológico. Como se discute en la sección 18.18, la producción de anticuerpos monoclonales capaces de unirse a antígenos blanco particulares se desarrolló a mediados de la década de 1970. Durante los siguientes 20 años más o menos, los intentos de usar estas proteínas como agentes terapéuticos se frustraron por varias razones. Lo más importante es que estos anticuerpos fueron producidos por células de ratón y codificados por genes de ratón. Como resultado, los anticuerpos se reconocieron como extraños y se eliminaron del torrente sanguíneo, antes de que tuvieran la oportunidad de funcionar. En los esfuerzos posteriores, los investigadores pudieron producir "anticuerpos humanizados"; dichos anticuerpos son en gran parte proteínas humanas, excepto por una porción relativamente pequeña que reconoce el antígeno, que sigue siendo "de ratón". En los últi-

mos años, los investigadores produjeron anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos completamente humana.

La herceptina es un anticuerpo humanizado dirigido contra un receptor de la superficie celular (HER2) que se une a un factor de crecimiento que estimula la proliferación de células de cáncer mamario. Se cree que la herceptina inhibe la activación del receptor por el factor de crecimiento y estimula la internalización del receptor (consúltese sección 8.19). Aproximadamente 25% de los cánceres de mama están compuestos por células con expresión excesiva del gen *HER2*, lo que hace que estas células sean especialmente sensibles a la estimulación del factor de crecimiento. Hasta el desarrollo de la herceptina, los pacientes cuyos tumores sobreexpresaban *HER2* tenían un pronóstico desfavorable, sin embargo, ahora ha mejorado mucho. Por ejemplo, un estudio de 3 000 mujeres con cáncer de mama en etapa temprana informó que la herceptina redujo la probabilidad de recurrencia de la enfermedad en alrededor de 50% en un periodo de 4 años. Los ensayos recientes sugieren que la supervivencia se puede aumentar combinando la herceptina con otro anticuerpo monoclonal (Omnitarg) que interfiere con la dimerización de HER2. Hasta la fecha, el anticuerpo humanizado más efectivo es el Rituxan, que fue aprobado en 1997 para el tratamiento del linfoma de células B no Hodgkin. El Rituxan se une a una proteína de la superficie celular (CD20) que está presente en las células B malignas en, aproximadamente, 95% de los casos de esta enfermedad. La unión del anticuerpo a la proteína CD20 inhibe el crecimiento celular e induce a las células a sufrir apoptosis. La introducción de este anticuerpo (junto con la quimioterapia) ha revertido las perspectivas para las personas con este cáncer en particular.

En los últimos años, se han probado varios anticuerpos completamente humanos en ensayos clínicos contra diversos tipos de cáncer. Uno de estos, llamado Vectibix, que está dirigido contra el receptor del EGF, ha sido aprobado como un tratamiento de agente único para el cáncer de colon metastásico que expresa EGFR. Debido a que es una proteína humana, Vectibix permanece en la circulación el tiempo suficiente para ser administrado una vez cada 2 semanas. Otro anticuerpo monoclonal humano, llamado Arzerra, ha sido aprobado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica. Al igual que el Rituxan, Arzerra se une a CD20 en la superficie de las células B. Además, en la actualidad se desarrollan varios anticuerpos que contienen un átomo radiactivo o un compuesto tóxico conjugado con la molécula de anticuerpo. El anticuerpo dirige el complejo hacia la célula cancerosa, y el átomo o compuesto asociado mata a la célula blanco. En el momento en que se escribe este texto, se aprobaron dos anticuerpos anti-CD20 marcados radiactivamente (Zevalin y Bexxar), para el tratamiento del linfoma de células B no Hodgkin, y se aprobó un anticuerpo anti-CD30 vinculado a un compuesto tóxico (Adcetris) para tratar el linfoma de Hodgkin.

La *inmunoterapia activa* (o *adoptiva*) es un enfoque que intenta que el sistema inmunológico de una persona se involucre más en la lucha contra las células malignas. El sistema inmunológico ha evolucionado para reconocer y destruir materiales extraños, pero los cánceres provienen de las propias células de una persona. Aunque muchas células tumorales contienen proteínas que no son expresadas por sus contrapartes normales (los llamados antígenos asociados con tumores o neoantígenos), o proteínas mutadas (p. ej., $BRAF^{V600E}$) que son diferentes de las presentes en las células normales, aún son básicamente proteínas del hospedero presentes en células del hospedero. Como resultado, el sistema inmunológico generalmente no reconoce estas proteínas como inapropiadas. Incluso si una persona posee células inmunitarias que reconocen ciertos antígenos asociados a tumores, los tumores desarrollan una serie de mecanismos que les permiten escapar de la destrucción inmune. Se han formulado muchas estrategias diferentes para superar estos obstáculos y estimular de manera artificial el sistema inmunológico, con el fin de que desarrolle una respuesta más vigorosa contra las células tumorales.

Algunas células tumorales son capaces de evadir el sistema inmune mediante la expresión de ligandos para receptores de células T, llamados CTLA-4 y PD-1, que amortiguan la actividad de las células T cuando se unen y limitan la respuesta inmune antitumoral del cuerpo. Las terapias basadas en anticuerpos que se dirigen a CTLA-4 y PD-1 han sido aprobadas para uso clínico, pero se ha comprobado que tienen una eficacia limitada contra la mayoría de los cánceres. Sin embargo, un nuevo ensayo en fase I que utiliza un anticuerpo monoclonal contra PD-L1 (el ligando para PD-1) ha demostrado ser prometedor en el tratamiento de una amplia gama de tumores sólidos, incluidos los cánceres de pulmón de células no pequeñas y los melanomas.

Otros enfoques se centran en estimular una respuesta inmunitaria contra una proteína que se sabe que está presente en sus células cancerosas, como HER2 en el caso de una persona que padece cáncer de mama, o antígeno carcinoembrionario (CEA, *carcinoembryonic antigen*) en una persona con cáncer de páncreas. Si se puede estimular al cuerpo para que monte una respuesta inmunitaria contra la proteína, esa respuesta tiene el potencial de atacar a las células cancerosas que tienen esa proteína en su superficie. En la mayoría de los enfoques inmunoterapéuticos, las células inmunitarias se aíslan del paciente, se modifican o se estimulan de una manera u otra *in vitro*, se dejan proliferar en el cultivo y luego se reintroducen en el paciente. Durante muchos años, los ensayos clínicos que utilizaron esta estrategia fueron decepcionantes, pero las publicaciones recientes han proporcionado razones para un optimismo cauteloso. En muchos de estos estudios, una minoría significativa de pacientes ha mostrado una respuesta positiva al tratamiento, lo que significa que sus tumores se han reducido, al menos, en tamaño o extensión, y que el tiempo de supervivencia esperado del paciente ha aumentado de manera significativa. La causa de que algunos pacientes respondan, mientras que la mayoría no, es aún un asunto de investigación. Consideraremos brevemente dos de los ejemplos más prometedores de este tipo general de inmunoterapia basada en células. Debido a que los dos tratamientos que se describen tienen que ser personalizados para cada paciente, es probable que sean muy costosos, en caso de que alguna vez sean aprobados y estén ampliamente disponibles.

Algunos de los nuevos tratamientos se centran en la ingeniería de las células inmunitarias para atacar a las células tumorales. El DCVax se encuentra actualmente en ensayos de fase III para el tumor cerebral altamente letal, glioblastoma. El DCVax utiliza células dendríticas que se extrajeron de la sangre del paciente, se estimularon *in vitro* con antígenos del propio tumor del enfermo y luego se inyectaron nuevamente en el cuerpo del paciente. Debido a que la estrategia implica la exposición de células dendríticas a proteínas específicas con el objetivo de generar una respuesta inmune, el DCVax se describe como una "vacuna contra el cáncer". El "proceso de elaboración" toma alrededor de 10 días y proporciona suficientes células para varios años de tratamiento. Aunque el número de pacientes tratados hasta la fecha se limita a unas pocas docenas, la vacuna parece haber extendido el tiempo de supervivencia promedio de los pacientes a más de 3 años, desde el momento del diagnóstico. Sin tal tratamiento, estos pacientes probablemente habrían muerto en alrededor de 15 meses. Hasta julio de 2011, 33% de los pacientes tratados había sobrevivido al menos 4 años y 27% había sobrevivido al menos 6 años. Menos de 5% de los pacientes que reciben tratamientos convencionales sobreviven 5 años. El DCVax se encuentra en la actualidad en ensayos para el tratamiento de otros cánceres, incluido el cáncer de ovario metastásico, el cáncer de próstata y los cánceres de tumores sólidos.

En agosto de 2011, los resultados de un ensayo de fase I llevado a cabo en tres pacientes con leucemia linfocítica crónica avanzada (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*) se informaron tanto en la literatura como en los medios de comunicación. Los ensayos de fase I normalmente se llevan a cabo para determinar 1) si un me-

dicamento es seguro y 2) su dosis adecuada. En este caso, el tratamiento dio como resultado la remisión completa de la enfermedad en dos de los pacientes y, al menos, una remisión parcial en el tercero. Para llevar a cabo el tratamiento, Carl June y sus colegas de la Universidad de Pennsylvania primero aislaron células T de la sangre de cada uno de los pacientes. Como se discutirá en el capítulo 17, las células T transportan una proteína multisubunidad en la superficie de sus células llamada receptor de células T (o TCR, *T cell receptor*). El TCR determina con cuáles moléculas específicas (antígenos) reaccionará una célula T dada y, en consecuencia, qué células blanco atacará y, probablemente, matará esa célula T. En su mayor parte, las células T no poseen TCR que les permita reaccionar con otras células en el cuerpo, lo que protege al cuerpo de un ataque contra él mismo. En este ensayo clínico, los investigadores aislaron células T y luego modificaron mediante ingeniería genética estas células, utilizando un vector viral, para transportar un TCR específico de alta afinidad que permitiría a las células T reaccionar y matar las células huésped que poseen una proteína CD19 en su superficie. Las únicas células que por lo regular llevan la CD19 son las células B, tanto las versiones normales como las que son parte del cáncer de CLL. Cuando estas células T se modificaron desde el punto de vista genético, sus números se expandieron enormemente en el cultivo y entonces se volvieron a infundir en el paciente del cual se obtuvieron las células T en un inicio. En 1 o 2 semanas, los pacientes sufrieron una enfermedad caracterizada por fiebre muy alta, disminución de la presión arterial e insuficiencia renal. Estos síntomas fueron el resultado de la guerra dentro de sus cuerpos entre las células T infundidas (y el gran número de su progenie que se formó en el cuerpo después de la infusión) y la gran cantidad de células cancerosas que estos pacientes portaban. Se estimó que cada célula T infundida fue responsable de la muerte de más de 1 000 células de CLL. Al final, los pacientes se quedaron con un número relativamente pequeño de células T de memoria modificadas por ingeniería genética derivadas de la infusión, una ausencia virtual de células B normales debido a su destrucción por las células T y la ausencia de células malignas o, en un caso, una carga tumoral muy reducida. La presencia de las células T de memoria debe prevenir la reaparición de la CLL, así como la supresión de la formación de células B normales, lo que podría hacer que estos pacientes sean más susceptibles a la infección. Tenga en cuenta que el uso de células T modificadas genéticamente conlleva un riesgo considerable, ya que estas células T pueden atacar y matar a cualquier célula del cuerpo que tenga el antígeno específico. Como resultado, estos tipos de inmunoterapias basadas en células —llamadas receptor de antígeno quimérico o terapia CAR (*chimeric antigen receptor*)— tienen el potencial de causar efectos secundarios autoinmunes graves. Si bien los datos más recientes de los ensayos revelan una eficacia notable, con 15 pacientes, de 17, que mostraron una remisión completa, también se informaron dos muertes, probablemente debidas a los efectos secundarios del tratamiento.

Las inmunoterapias representan cerca de una cuarta parte de los más de 350 medicamentos anticancerosos experimentales que en el presente se están sometiendo a ensayos. Tanto las grandes compañías farmacéuticas como las pequeñas empresas de biotecnología han intensificado los esfuerzos para desarrollar y probar los fármacos inmunoterapéuticos y los tratamientos basados en CAR, de modo que han aumentado las expectativas de que algunos de estos nuevos tratamientos, potencialmente de alto impacto, pronto se conviertan en la línea principal.

**REPASO**

1. Describa las diferencias entre la inmunoterapia pasiva y la activa (o adoptiva).
2. Describa cómo se han utilizado las células T diseñadas para tratar con éxito el cáncer.

## 16.16 Inhibición de la actividad de las proteínas promotoras del cáncer

Las células cancerosas se comportan como lo hacen, porque contienen proteínas que están presentes en concentraciones anormales o muestran actividad anormal. Varias de estas proteínas se ilustraron en la figura 16-17. En muchos casos, el crecimiento o la supervivencia de las células tumorales depende de la actividad continua de una o más de estas proteínas desviadas. Esta dependencia se conoce como "adicción a oncogenes". Si la actividad de una de estas proteínas se puede bloquear selectivamente, debería ser posible matar a toda la población de células malignas. Con este objetivo en mente, los investigadores sintetizaron un arsenal virtual de compuestos de peso molecular pequeño que inhiben la actividad de las proteínas que promueven el cáncer. Algunos de estos medicamentos fueron diseñados para inhibir una proteína particular de estructura conocida, mientras que otros se identificaron mediante la selección aleatoria de un gran número de compuestos que han sido sintetizados por las compañías farmacéuticas. Una vez que se ha identificado un compuesto inhibidor de proteínas, por lo general se prueba su efectividad contra un panel de unos 60 tipos diferentes de células cultivadas, cada una aislada originalmente de un cáncer humano diferente. El uso de un panel diverso de células permite a los investigadores reconstituir la heterogeneidad genética y las diversas sensibilidades a los medicamentos que se encuentran entre los cánceres humanos. El éxito contra células cultivadas por lo general conduce a pruebas del agente en ratones inmunocomprometidos que llevan trasplantes de tumores humanos (xenoinjertos). En la tabla 16-2 se muestra una lista de algunos de los agentes que se han probado en ensayos clínicos. Aunque numerosos compuestos en esta lista han demostrado ser prometedores para detener el crecimiento de varios tipos de tumores, uno en particular ha tenido un éxito sin precedentes en el tratamiento de pacientes con leucemia mielógena crónica (CLM, *chronic myelogenous leukemia*).

Antes se señaló que ciertos tipos de cánceres se inician mediante translocaciones cromosómicas específicas. La CML es causada por una translocación que pone a un protooncogén (*ABL*) en contacto con otro gen (*BCR*) para formar un gen quimérico (*BCR-ABL*). Las células formadoras de sangre que llevan esta translocación expresan un alto nivel de actividad de tirosina cinasa ABL, lo que hace que las células proliferen de manera incontrolable e inicien el proceso de oncogénesis. Como se discutió en la página 75, se identificó un compuesto llamado Gleevec que inhibe selectivamente la cinasa ABL, al unirse a la forma inactiva de la proteína y prevenir su fosforilación por otra cinasa, que se requiere para la activación de ABL. Los ensayos clínicos iniciales con el Gleevec tuvieron un éxito importante, lo que provocó que casi todos los pacientes con CML que recibieron el medicamento a una dosis suficientemente alta entraran en remisión. Estos estudios confirmaron la idea de que la eliminación de un único producto oncogénico requerido podría detener el crecimiento de un cáncer humano. El medicamento fue aprobado enseguida y ha estado en uso durante años. Los pacientes deben continuar con el empleo del medicamento para permanecer en remisión, y muchos de ellos, sobre todo aquellos que comenzaron el tratamiento en una etapa avanzada, eventualmente desarrollan resistencia al medicamento. La mayoría de los casos de resistencia resultan de mutaciones en la porción *ABL* del gen de fusión. Esto ha llevado al desarrollo de una segunda generación de inhibidores dirigidos que permanecen activos contra la mayoría de las formas mutadas de la cinasa ABL (véase figura 2-51*d*). Estos fármacos parecen ser efectivos en el tratamiento de casos de CML resistentes a Gleevec y sugieren que el régimen de medicamentos ideal puede consistir en un coctel de varios inhibidores diferentes que atacan distintas partes de la misma proteína, asegurando que no surjan mutantes resistentes a los medicamentos.

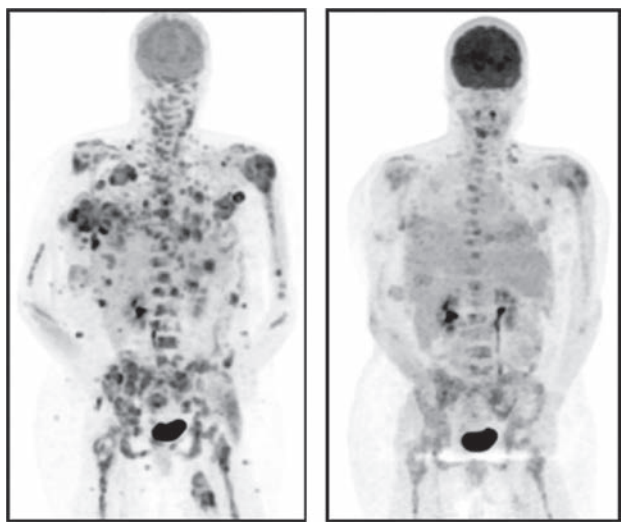
**TABLA 16-2 Ejemplos de terapias dirigidas de moléculas pequeñas que han sido aprobadas por la FDA o se encuentran en proceso para su aprobación**

| Fármaco | Objetivo | Mecanismo de acción |
|---|---|---|
| Gleevec, Tasigna | BCR-ABL, KIT, PDGFR | Inhibidor de la tirosina cinasa |
| Sprycel | BCR-ABL, familia SRC | Inhibidor de la tirosina cinasa |
| Iressa, Tarceva | EGFR | Inhibidor de la tirosina cinasa |
| Zactima | VEGFR, EGFR | Inhibidor de la tirosina cinasa |
| Sutent, Votrient | VEGFR, PDGFR, KIT | Inhibidor de la tirosina cinasa |
| Tykerb | EGFR, HER2 | Inhibidor de la tirosina cinasa |
| Nexavar | BRAF, KIT, VEGFR | Inhibidor de la cinasa |
| Zelboraf | $BRAF^{V600E}$ | Inhibidor de la cinasa |
| GDC-0973 | MEK | Inhibe la cascada MAPK |
| Velcade, Carfilzomib | proteasoma | Inhibe la degradación de proteínas |
| Zolinza, Istodax | HDAC | Inhibe la acetilación de histonas (¿efecto epigenético?) |
| Erivedge | Alisado de la vía Hh | Bloquea el crecimiento celular y la vía de supervivencia |
| Torisel, Afinitor | mTOR | Bloquea la vía de supervivencia celular |
| BKM120, PX866 | PI3K | Bloquea la vía de supervivencia celular |
| BEZ235, BGT226 | PI3K, mTOR | Bloquea la vía de supervivencia celular |
| Perifosine, MK2206 | PKB/AKT | Bloquea la vía de supervivencia celular |
| Trisenox (trióxido de arsénico) | NF-κB | Bloquea la vía de supervivencia celular |
| Seliciclib | CDK2 | Induce la apoptosis |
| Tamoxifeno, Raloxifeno | Receptor de estrógeno | Bloquea la acción del estrógeno |
| Arimidex, Aromasin | Aromatasa | Inhibe la síntesis de estrógenos |
| Zytiga | CYP17 | Inhibe la síntesis de andrógenos |
| Genasense, ABT-263 | BCL-2 | Induce la apoptosis |
| 17-AAG | HSP90 | Inhibe la chaperona molecular |
| Nutlins | p53 | Inhibe la interacción p53-MDM2 |
| PRIMA-1 | p53 | Restaura la actividad p53 mutante |
| PX-478 | HIF-1 | Inhibe este factor de transcripción que se activa por hipoxia |
| Veliparib, Rucaparib | PARP-1 | Bloquea la reparación de DNA basada en HR |
| Dacogen, Vidaza | DNMT | Inhibe la metilación de DNA |



Se esperaba que al Gleevec le siguieran con rapidez otros fármacos inhibidores de proteínas altamente efectivos. Aunque una serie de inhibidores de moléculas pequeñas dirigidas a proteínas han mostrado un éxito modesto en los ensayos clínicos y han sido aprobados por la FDA, y cientos de otros todavía se encuentran en ensayos clínicos, ninguno de los fármacos estudiados hasta la fecha ha podido detener por completo el crecimiento de cualesquiera de los cánceres sólidos comunes, a saber, los de mama, pulmón, próstata o páncreas. Un gran éxito se ha logrado (consúltese **FIGURA 16-24**). Un medicamento llamado Zelboraf (vermurafenib) se aprobó recién para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico, cuyo cáncer se debe a una versión mutada específica de BRAF, una en la que el residuo de valina normal en la posición 600 se reemplaza por un ácido glutámico ($BRAF^{V600E}$), y de esta manera cambia la forma del sitio activo. Esta mutación ocurre en alrededor de 50% de los pacientes con melanoma y Zelboraf bloquea específicamente la actividad de esta enzima mutante sin afectar la proteína normal. Al igual que con Gleevec, los pacientes desarrollan resistencia a Zelboraf pero, a diferencia de Gleevec, la resistencia aparece mucho antes (por lo general, después de 7 meses de tratamiento) y, en la mayoría de los casos, resulta de mutaciones en otros genes, en lugar de mutaciones secundarias en *BRAF*. La resistencia a Zelboraf por lo general ocurre porque la vía MAPK una vez más se vuelve constitutivamente activa, evitando la necesidad de la actividad cinasa BRAF de las células, que continúa siendo inhibida por el medicamento. Se están realizando estudios para combinar Zelboraf con inhibidores de los componentes posteriores de la vía, como MAPK o ERK. Es poco probable que un tumor albergue células que sean resistentes a dos fármacos que se dirijan a dos vías diferentes o dos proteínas distintas en la misma vía. En consecuencia, un enfoque que utilice una combinación de medicamentos puede ser la mejor manera de bloquear la aparición de células resistentes. Este uso de la terapia farmacológica combinada ya ha demostrado ser muy efectivo para bloquear la aparición de cepas resistentes del VIH en pacientes infectados y, como las células cancerosas, el VIH también es altamente mutable. Lo desafortunado es que la inhibición de algunas de estas proteínas de señalización clave en las células cancerosas puede tener efectos secundarios graves como resultado de sus acciones en las células normales del cuerpo.

Las razones de la falta de desarrollo de fármacos que puedan erradicar tumores sólidos epiteliales (carcinomas) no están del todo claras. Una razón puede ser que estos tumores son más complejos desde el punto de vista genético y que las células no son



*a*) *b*)

**FIGURA 16-24 Efectos terapéuticos del fármaco Zelboraf (PLX4032) en pacientes con melanoma metastásico que albergan una oncoproteína mutante $BRAF^{V600E}$.** Estas PET de un paciente antes de (*a*) y dos semanas después del inicio del tratamiento (*b*) muestran los notables efectos beneficiosos de este medicamento. Las regiones oscuras de la exploración muestran las ubicaciones de las lesiones cancerosas metabólicamente activas. El nuevo crecimiento tumoral ocurre en muchos de los pacientes, debido a la aparición de clones resistentes a los medicamentos.

FUENTE: Tomada de Gideon Bollag, *et al. Nature* 2010;467:599; © 2010, reimpreso con autorización de Macmillan Publishers Ltd.

tan dependientes de un solo producto oncogénico y de una vía de señalización anormal, como lo son los cánceres de células sanguíneas y el melanoma. Otra razón puede ser que sólo una fracción de los pacientes con un tipo particular de tumor es sensible a un medicamento específico. Esto se sugirió primero en estudios con el fármaco Iressa, un inhibidor de la tirosina cinasa del receptor de EGF (EGFR, *EGF receptor*). El fármaco Iressa se probó en un inicio en pacientes con cáncer de pulmón, porque se sabía que estos tumores exhibían altos niveles de EGFR. Los ensayos clínicos iniciales encontraron que cerca de 10% de los pacientes en Estados Unidos y 30% de los pacientes japoneses respondieron positivamente al fármaco, mientras que la población restante no se vio afectada. Estudios posteriores sobre cánceres que contenían mutaciones de *EGFR* indicaron que la orientación del EGFR mutante sólo era potencialmente exitosa si el paciente tenía *KRAS* de tipo salvaje. Aquellos pacientes cuyos cánceres también exhibieron un gen *KRAS* mutante no respondieron. Como resultado, los cánceres de pulmón (y colon) ahora se analizan para detectar mutaciones *KRAS,* antes de que se inicie la terapia anti-EGFR. En la actualidad, se descubrió que el medicamento Xalkori es altamente efectivo en el tratamiento de un subgrupo selecto de pacientes con cáncer de pulmón que tenían genes *EGFR* normales, pero que expresaban una proteína de fusión EML4-ALK que resulta de una translocación cromosómica. Xalkori inhibe la cinasa ALK. El fármaco fue aprobado junto con una prueba de "diagnóstico complementario", que utiliza la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, *fluorescence* in situ *hybridization*), para identificar la presencia de la reordenación, que se produce en alrededor de 5% de los pacientes. Estos hallazgos confirman la idea de que no todos los casos de un cáncer en particular pueden tratarse por igual. En su lugar, las terapias dirigidas contra el cáncer tendrán que adaptarse a las modificaciones genéticas específicas presentes en los tumores de pacientes individuales. Con esto en mente, varios centros importantes de cáncer han comenzado programas para secuenciar un panel de genes seleccionados en pacientes con ciertos tipos de cáncer. Esta información también se utiliza para ayudar a seleccionar individuos que participen en ensayos clínicos, lo que aumenta la probabilidad de encontrar medicamentos que sean efectivos para tratar subconjuntos de pacientes con cierto tipo de cáncer. Sin este tipo de detección genética, las señales positivas de un fármaco que podría ser útil para un subconjunto de pacientes podrían desaparecer por la falta de beneficios clínicos para la población en general. El desafío actual es identificar marcadores genéticos que tengan valor para predecir el éxito o el fracaso de una terapia determinada.

Esta sección se ha centrado en terapias dirigidas que inhiben proteínas que son anormales o se expresan de manera anormal en las células cancerosas. Pero también puede haber proteínas que tengan una estructura y expresión normales, pero, por alguna razón, desempeñan un papel importante en la vida de las células cancerosas. Los inhibidores que atacan tales proteínas podrían tener un potencial considerable como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer. Se ha visto en este capítulo cómo las células cancerosas contienen mutaciones en una amplia variedad de genes, muchos de los cuales conducen a la inhibición general de ciertas vías metabólicas o de señalización. Si bien esto puede ayudar a promover el crecimiento y la supervivencia de estas células cancerosas, también puede hacer que se vuelvan más dependientes que las células normales de otras vías que continúan sus operaciones de manera normal. Recientes anuncios que aclaman la promesa de los inhibidores de PARP-1 en el tratamiento de varios tipos de cáncer son un ejemplo de este tipo de razonamiento. PARP [que es un acrónimo de poli(ADP-ribosa) polimerasa] es una enzima poco conocida que participa en numerosos procesos relacionados con el metabolismo del DNA, incluida la reparación del DNA. Los inhibidores de PARP-1 han demostrado ser particularmente prometedores en el tratamiento de los cánceres de mama y de ovario que presentan deficiencias en BRCA1 o BRCA2. Como se analizó en la sección 13.8, las proteínas BRCA están involucradas en la reparación del DNA y se considera que tales células cancerosas son más dependientes que las células normales de otras vías de reparación del DNA, incluidas aquellas que requieren PARP-1. Una vez que PARP-1 se inhibe en células tumorales deficientes en BRCA, ciertos tipos de daño en el DNA no pueden repararse, lo que hace que las células mueran por apoptosis. Este tipo de tratamiento se basa en una estrategia de "letalidad sintética", que sugiere que las mutaciones o la inhibición de una sola proteína (p. ej., BRCA o PARP) no tienen ningún efecto sobre la viabilidad celular, sino que las mutaciones o la inhibición de dos proteínas diferentes dejan a la célula incapaz de realizar una o más funciones esenciales. Más importante aún, este enfoque proporciona una estrategia general para atacar a las células cancerosas que han perdido la función de una proteína supresora de tumores en particular, en este caso BRCA1 o BRCA2. También podría idearse una estrategia similar para atacar a las células cancerosas que han perdido la función de p53, por ejemplo, porque dichas células también deben ser vulnerables a los medicamentos que no tienen efecto en las células normales, que poseen vías intactas de supresión de tumores. Podría ser posible encontrar genes que puedan ser sensibles a la letalidad sintética registrando los datos de estudios de genómica del cáncer, para buscar 1) dos genes que nunca se mutan juntos en el mismo tumor o 2) genes que nunca se mutan en ningún caso de un cáncer en particular. Los genes en esta última categoría son presumiblemente necesarios para la supervivencia de las células cancerosas y representan posibles objetivos farmacológicos.

**REPASO**

1. Describa el mecanismo de acción del fármaco Gleevec.

## 16.17 Concepto de una célula madre del cáncer

Otra razón del fracaso para desarrollar terapias dirigidas más efectivas puede ser que los agentes no estén dirigidos a las células apropiadas dentro del tumor. Esta posibilidad requiere una explicación más detallada, pero plantea un problema importante tanto para la biología básica del cáncer como para su tratamiento. A lo largo de este capítulo, se ha considerado que un tumor es una masa de células relativamente homogéneas. Cuando se ven de esta manera, todas las células en un tumor son capaces de proliferación ilimitada y todas las células tienen la oportunidad de evolucionar hacia un fenotipo más maligno como resultado del cambio genético en curso. En los últimos años, ha surgido un nuevo concepto que sugiere que si bien la mayoría de las células de un tumor se pueden dividir a una velocidad rápida, tienen un potencial a largo plazo relativamente limitado para sostener el tumor primario o iniciar un nuevo tumor secundario. En cambio, una fracción relativamente pequeña de células dispersas en todo el tumor es responsable de mantener el tumor y promover su diseminación. Estas células "especiales" se conocen como **células madre cancerosas**,[6] y existe evidencia experimental considera-

[6] Debe tenerse en cuenta que varios experimentos se oponen a la existencia de células madre cancerosas raras, y el tema es centro del debate actual. Las células madre del cáncer se definen esencialmente mediante un solo ensayo: inyección de células en ratones inmunodeficientes. La pregunta principal en este debate es qué tan grande es la fracción de células en un tumor que puede volver a crecer en este ensayo. Varios estudios sugieren que la respuesta a esta pregunta depende del grado en que el animal que recibe las células tumorales está inmunocomprometido, en lugar de la naturaleza de las células que se inyectan. También existe una gran polémica sobre el grado en que las células madre del cáncer pueden definirse mediante nuevos marcadores de superficie celular. Para una discusión sobre este tema véanse *Science* 2009;324:1670; *Cell* 2009;138:822; *Nature Med* 2011;17:313 y *Science* 2015;347:226.

ble de su existencia en leucemias, tumores cerebrales, tumores de mama y otros tipos de cáncer. En la mayoría de los casos, la evidencia de la existencia de células madre cancerosas se basa en el hallazgo de que sólo una subpoblación de células en un tumor humano determinado puede iniciar la formación de un nuevo tumor, luego de que se inyectaran en un ratón susceptible (inmunodeficiente). Esas células que son capaces de hacer crecer de nuevo el tumor en el animal inoculado, a menudo poseen ciertas proteínas de superficie que las distinguen de las células que forman la mayor parte del tumor, y son estos marcadores los que sirven para definir la célula madre del cáncer. El término *célula madre del cáncer* no sugiere nada sobre el origen de estas células, ya sea de una célula madre de tejido o de otro tipo. Tampoco implica que las células madre del cáncer se parezcan necesariamente a las células madre del tejido normal. En su lugar, se definen sólo como las células capaces de propagar o hacer crecer de nuevo el tumor.

El concepto de la célula madre del cáncer se plantea en este punto del capítulo, porque tiene consecuencias importantes para la terapia del cáncer. Si es cierto que sólo una pequeña subpoblación de células en un tumor tiene la capacidad de continuar con la vida de ese tumor, entonces el desarrollo de medicamentos que eliminen con rapidez la mayor parte de una masa tumoral, pero evite las células madre del cáncer, está condenado al fracaso. Esta es probablemente la razón por la que los pacientes con CML deben continuar tomando Gleevec para mantener su enfermedad en remisión; Gleevec no parece matar a las células iniciadoras de leucemia responsables de la recurrencia de la enfermedad. Un número de medicamentos dirigidos a las células madre del cáncer están hoy por hoy en fase de prueba, y un pequeño número se ha mostrado prometedor. Tarextumab, por ejemplo, que se dirige a las proteínas de señalización de la familia Notch, se cree que hace que las células madre del cáncer se diferencien en células tumorales, lo que las hace susceptibles a los tratamientos de quimioterapia. Recientemente se informó que 24, de 29 pacientes con cáncer de páncreas (por lo general resistente a la quimioterapia) que fueron tratados con tarextumab junto con medicamentos convencionales, experimentaron estabilización o reducción de sus tumores.

**REPASO**

1. ¿Qué son las células madre del cáncer y cuál es la evidencia de su existencia?



## 16.18 Inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)



A medida que un tumor crece en tamaño, estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso denominado *angiogénesis* (obsérvese **FIGURA 16-25**). Los vasos sanguíneos deben suministrar nutrientes y oxígeno a las células tumorales de rápido crecimiento y eliminar sus productos de desecho. Los vasos sanguíneos también proporcionan los conductos para que las células cancerosas se diseminen a otros sitios del cuerpo. En 1971, Judah Folkman, de la Universidad de Harvard, sugirió que los tumores sólidos podrían destruirse al inhibir su capacidad para formar nuevos vasos sanguíneos. Después de un cuarto de siglo de relativa oscuridad, esta idea floreció en una terapia anticancerosa promisoria.

Las células cancerosas promueven la angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento, como VEGF, que actúa sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos circundantes, estimulándolas para que proliferen y se desarrollen en nuevos vasos. Las compañías de biotecnología han desarrollado una variedad de inhibidores de la angiogénesis, incluidos los anticuerpos y los compuestos sintéticos dirigidos contra las integrinas, los factores de crecimiento y los receptores del factor de crecimiento. Los estudios preclínicos en ratones y ratas sugirieron que los inhibidores de la angiogénesis podrían ser efectivos para detener el crecimiento del tumor. Lo más significativo es que los tumores tratados con estos inhibidores en estudios preclínicos no se volvieron resistentes a la aplicación repetida de medicamentos. Las células tumorales se vuelven resistentes a los agentes quimioterapéuticos habituales, porque las células son genéticamente inestables y pueden evolucionar hacia formas resistentes. Sin embargo, los inhibidores de la angiogénesis se dirigen a células endoteliales genéticamente estables y normales, que continúan respondiendo a la presencia de estos agentes.

La inhibición de la angiogénesis en tumores humanos no se logra con tanta facilidad como se podría haber esperado, según los estudios con ratones. Hasta la fecha, los resultados más prometedores se han obtenido con un anticuerpo humanizado (llamado Avastin) que se dirige contra VEGF, el factor de crecimiento de células endoteliales que se sobreexpresa en la mayoría de los tumores sólidos. El Avastin bloquea al VEGF para que no se una y active su receptor, VEGFR. La aprobación de la FDA se basó en ensayos clínicos que demostraron que Avastin, en combinación

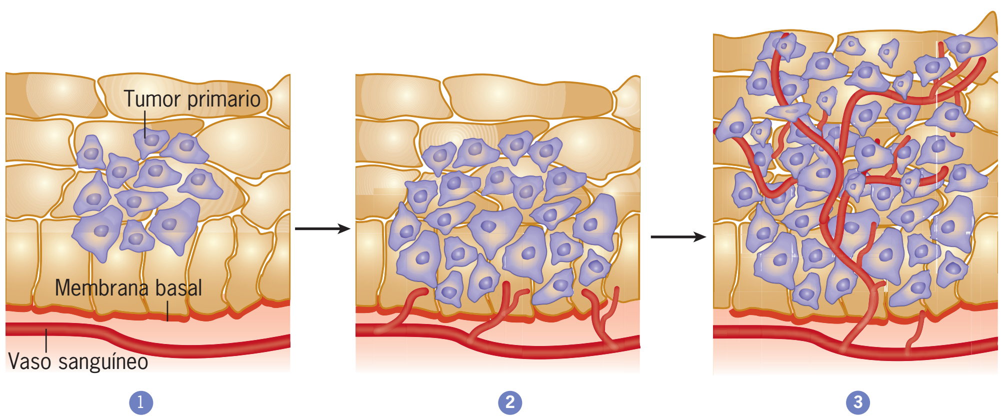



**FIGURA 16-25 Angiogénesis y crecimiento tumoral.** Pasos en la vascularización de un tumor primario. En el paso 1, el tumor prolifera para formar una pequeña masa de células. Mientras sea avascular (sin vasos sanguíneos), el tumor permanece muy pequeño (1 a 2 mm). En el paso 2, la masa tumoral ha producido factores angiogénicos que estimulan el crecimiento de las células endoteliales de los vasos cercanos hacia las células tumorales. En el paso 3, el tumor se ha vascularizado y ahora es capaz de un crecimiento ilimitado.

FUENTE: Tomada de BR Zetter, con permiso de *Annual Review of Medicine*, Vol. 49; derechos de autor 1998. *Annual Review of Medicine* por Annual Reviews. Reproducido con autorización de Annual Reviews en el formato publicado en un libro a través de Copyright Clearance Center.

con la quimioterapia estándar, podría prolongar la vida de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico durante varios meses. Estudios posteriores sugirieron que Avastin podría agregar varios meses a la vida de pacientes con otros tipos de tumores sólidos, pero esta conclusión ha sido debatida, sobre todo en casos de cáncer de mama. Queda por verse si la inhibición de la angiogénesis se demostrará alguna vez como una terapia efectiva, pero en la actualidad, el interés en esta estrategia terapéutica ha disminuido.

Para el futuro previsible, la mejor estrategia contra el cáncer es la detección temprana. El tiempo que transcurre entre el inicio de uno de los cánceres epiteliales comunes y su progresión a una enfermedad metastásica mortal generalmente se considera, al menos, de una década y, a menudo, mucho más. En consecuencia, hay tiempo suficiente para detectar estos cánceres, antes de que se conviertan en una amenaza para la vida. En la actualidad se utilizan varios procedimientos de detección, entre ellos, la mamografía para detectar el cáncer de mama, las pruebas de Papanicolaou para detectar el cáncer de cuello uterino, las determinaciones del PSA para detectar el cáncer de próstata y la colonoscopia para detectar el cáncer colorrectal. Se espera que los avances en proteómica conduzcan, de manera uniforme, al desarrollo de nuevas pruebas de detección basadas en los niveles relativos de varias proteínas presentes en la sangre u otros fluidos corporales. Este enfoque se trató con cierto detalle en la página 72. Hay otros indicadores biológicos transmitidos por la sangre (biomarcadores) que podrían revelar la presencia de cáncer, incluido el DNA mutante, los miRNA en particular, los carbohidratos anormales y los metabolitos distintivos. Se están investigando pruebas de detección basadas en cada uno de estos tipos de biomarcadores.[7]

[7] Hay una opinión generalizada de que es probable que el aumento de los procedimientos de detección temprana permita identificar un mayor número de cánceres que nunca serán potencialmente mortales y, en consecuencia, aumentará el costo y debilitará los efectos secundarios de los tratamientos que no afectan las tasas de supervivencia (discutido en Ann Rev Med 2009;60:125). La evidencia más convincente del valor de tales procedimientos proviene de un estudio reciente que encontró que la extirpación de pólipos durante una colonoscopia reduce en gran medida la probabilidad de muerte por cáncer de colon (*NEJM* 2012; 366:687.)

## REPASO

1. ¿Cómo promueven las células cancerosas la angiogénesis?

# CAPÍTULO 17

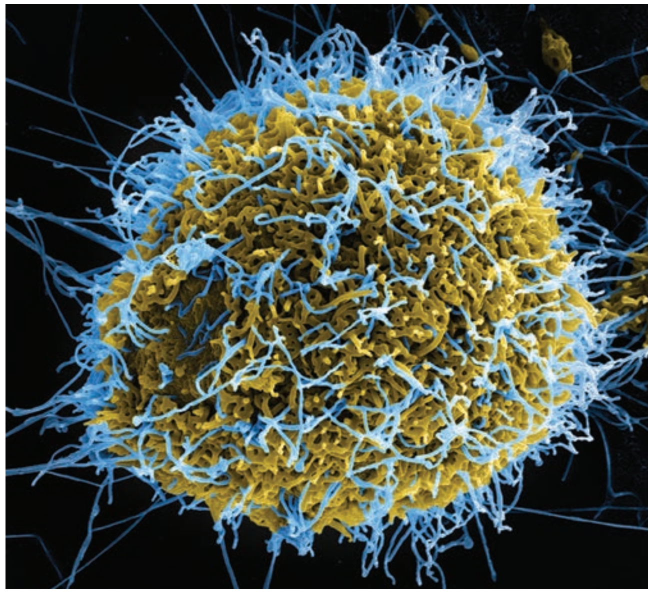
# La respuesta inmune

## LUCHANDO CONTRA EL ÉBOLA

En la primavera de 2014, un niño en África occidental fue infectado por el virus del Ébola, lo que trajo como consecuencia una fiebre hemorrágica mortal. Durante el año siguiente, esta enfermedad altamente contagiosa se extendió con rapidez, terminando con la vida de al menos la mitad de los infectados, y cuyo saldo mortal fue de miles. Desde su descubrimiento en la década de 1960, el virus del Ébola ha causado más de 30 brotes de fiebre hemorrágica, cada uno con una tasa de mortalidad por encima del 50% de los contagiados. ¿Cuál es la causa de la letalidad del virus del Ébola?

Tras la infección, generalmente a través del contacto directo con los fluidos corporales de un individuo infectado, el virus ingresa en las células blanco diana (principalmente glóbulos blancos) a través de la unión a los receptores de superficie de la célula e induce a que esta lo internalice. Similar a otros virus, el Ébola utiliza la maquinaria celular para transformar la célula infectada en una fábrica viral. La célula comienza a generar una gran cantidad de nuevas partículas virales, lo que trae como resultado la muerte de la célula hospedera. Los glóbulos blancos infectados con Ébola pueden viajar a través del sistema linfático, lo que permite que el

(*continúa*)



En esta micrografía electrónica pseudo-coloreada se muestran numerosas partículas virales de Ébola (azul) brotando de una célula infectada (amarillo).

FUENTE: Cortesía del (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID).

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


- **17.1** Visión general de la respuesta inmune
- **17.2** La teoría de la selección clonal aplicada a los linfocitos B
- **17.3** **PERSPECTIVA HUMANA:** Enfermedades autoinmunes
- **17.4** Vacunación
- **17.5** **VÍAS EXPERIMENTALES:** El papel del complejo principal de histocompatibilidad en la presentación de antígenos
- **17.6** Linfocitos T: activación y mecanismo de acción
- **17.7** La estructura modular de los anticuerpos
- **17.8** Reordenamientos de DNA que producen genes que codifican para receptores de antígenos de las células B y T
- **17.9** Complejos de receptores de antígeno unido a membrana
- **17.10** El complejo principal de histocompatibilidad
- **17.11** Distinguiendo propio de no propio
- **17.12** Los linfocitos se activan por señales de superficie celular
- **17.13** Vías de transducción de señales en la activación de linfocitos

virus se propague rápidamente por todo el cuerpo.

El Ébola parece emplear un ataque múltiple que le permite evadir una gran cantidad de defensas celulares que normalmente se activan en respuesta a una infección viral. Los interferones, por ejemplo, son proteínas de señalización que desempeñan un papel clave en la inmunidad innata mediante la regulación de un gran número de actividades antivirales, incluida la reducción de la traducción de proteínas, destruyendo RNA, induciendo muerte celular e inflamación, y la señalización a las células vecinas de la presencia de una infección. La investigación científica ha demostrado que el Ébola ha desarrollado numerosas formas de eludir diferentes clases de interferones, previniendo la activación de la respuesta inmune innata. La combinación de la muerte de la célula hospedera, la apoptosis "espectadora" de células T no infectadas (lo cual aún no se comprende bien), y la falta de proliferación adicional de glóbulos blancos produce linfopenia o un bajo nivel de glóbulos blancos. A medida que la enfermedad progresa, las membranas endoteliales y órganos se dañan, causando una extensa hemorragia.

La investigación científica sugiere que, cuando el daño tisular se convierte en un daño grave, las células inmunes algunas veces se activan para liberar de forma repentina una gran cantidad de moléculas de señalización proinflamatorias, o citocinas, en un intento tardío de controlar la infección viral. Se cree que esta dosis masiva de citocinas, llamada tormenta de citocinas, es uno de los eventos que contribuye a las altas tasas de mortalidad del Ébola.

En la actualidad se están realizando esfuerzos para desarrollar una vacuna que ayude a prevenir futuros brotes de Ébola y a desarrollar tratamientos basados en anticuerpos para los que ya están infectados. Los investigadores también intentan esclarecer cómo el Ébola y otros patógenos pueden evadir las numerosas defensas inmunológicas de nuestros cuerpos.



## 17.1 Visión general de la respuesta inmune

Los organismos vivos proporcionan hábitats ideales en los que otros organismos pueden crecer. No es sorprendente, por tanto, que los animales estén sujetos a infecciones por virus, bacterias, protistas, hongos y parásitos animales. Los vertebrados han desarrollado varios mecanismos que les permiten reconocer y destruir estos agentes infecciosos. Como resultado, los vertebrados son capaces de desarrollar una **inmunidad** contra los patógenos invasores. La inmunidad es resultado de las actividades combinadas de varias células diferentes, algunas de las cuales vigilan el cuerpo, mientras que otras se encuentran concentradas en los órganos linfoides, como la médula ósea, el timo, el bazo, y los ganglios linfáticos (véase **FIGURA 17-1**). Juntas, estas células dispersas y los órganos discretos forman el **sistema inmune** del cuerpo.

Las células del sistema inmune se involucran en un tipo de selección molecular mediante el cual reconocen las macromoléculas "extrañas", es decir, aquellas cuya estructura es diferente de las macromoléculas normales del cuerpo. Si se encuentra material extraño, el sistema inmune lleva a cabo un ataque específico y concertado contra él. Las armas del sistema inmune incluyen 1) células que matan o ingieren células infectadas o alteradas y 2) proteínas solubles que pueden neutralizar, inmovilizar, aglutinar o matar patógenos. Los patógenos, a su vez, continuamente evolucionan mecanismos contrarrestantes para evitar la destrucción inmune. El hecho de que los humanos padecemos una serie de enfermedades infecciosas crónicas, como el sida (causado por un virus), la tuberculosis (causada por una bacteria), y la malaria (causada por un protozoario) ilustra cómo los sistemas inmunes no siempre son exitosos para combatir estos patógenos microscópicos En algunos casos, el sistema inmune puede llevar a cabo una respuesta inapropiada que ataca a los propios tejidos del cuerpo. Como se discutió en Perspectiva Humana (véase sección 17.3) estos incidentes pueden conducir a una enfermedad grave.

Es imposible abarcar por completo el tema acerca de la inmunidad en un solo capítulo. En su lugar, nos enfocaremos en un número de aspectos seleccionados que ilustran principios de la biología celular y molecular que han sido analizados en capítulos previos. Para ello, es necesario examinar los eventos básicos de la respuesta corporal ante la presencia de un microbio intruso.

La superficie externa del cuerpo y los revestimientos de su tracto interno proporcionan una excelente barrera para evitar la penetración de virus, bacterias y parásitos. Si se rompen estas

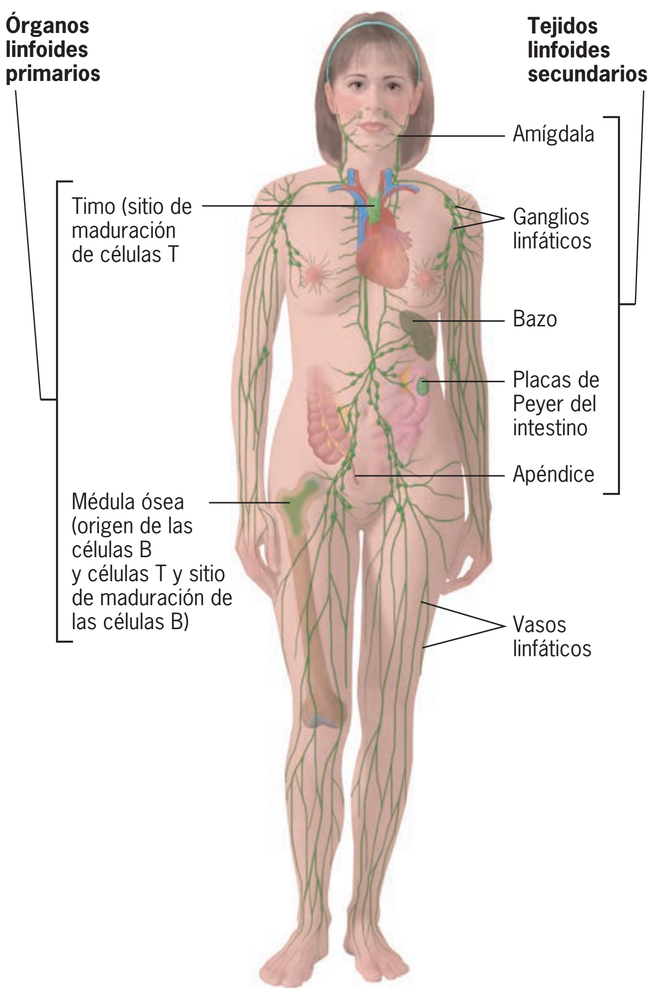



**FIGURA 17-1 El sistema inmune humano incluye varios órganos linfoides, como el timo, la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos y células dispersas localizadas como placas dentro del intestino delgado, el apéndice y las amígdalas.** El timo y la médula ósea a menudo se describen como el sistema inmune central debido a su papel clave en la diferenciación de linfocitos.

Fuente: De Wessner, *Microbiology*, 1e, Figura *20.4.* John Wiley & Sons Publishers. Reimpreso con permiso de John Wiley & Sons, Inc.

barreras de superficie, una serie de respuestas inmunes se inician para intentar contener y luego eliminar a los invasores. Las respuestas inmunes se pueden dividir en dos categorías generales: respuestas innatas y respuestas adaptativas (o adquiridas). Ambos tipos de respuestas dependen de la capacidad del cuerpo para distinguir entre los materiales que se supone existen (es decir, "propios") y aquellos que no están (es decir, extraños o "no propios"). También podemos distinguir dos categorías de patógenos: los que se producen principalmente dentro de una célula hospedera (todos los virus, algunas bacterias y ciertos parásitos protozoarios) y aquellos que se reproducen en los compartimientos extracelulares del hospedero (la mayoría de las bacterias y otros patógenos celulares). Diferentes mecanismos inmunes han evolucionado para combatir estos dos tipos de infecciones. Una visión general de algunos de estos mecanismos se muestra en la **FIGURA 17-2**.

## Respuestas inmunes innatas

Las **respuestas inmunes innatas** son aquellas que el cuerpo realiza sin requerir un contacto previo con el microbio. Por tanto, proporcionan al cuerpo una primera línea de defensa. Un patógeno invasor generalmente hace su contacto inicial con el sistema inmune innato cuando es reconocido por una célula fagocítica, como un macrófago o una célula dendrítica (véase la figura 17-10), cuya función es reconocer objetos extraños y hacer sonar una alarma apropiada. En 1989, Charles Janeway, Jr., de la Universidad de Yale, publicó una propuesta con visión de futuro para abordar el papel del sistema inmune innato tanto en su rol de proporcionar al cuerpo una protección inmediata contra los patógenos como en el de estimular las células del sistema inmune adaptativo para involucrarse posteriormente en la superación de la amenaza. Limitaremos el análisis actual al sistema inmune innato, sobre el cual Janeway propuso que sus células poseen una variedad de sensores microbianos que reconocen directamente ciertas macromoléculas altamente conservadas, las cuales desempeñan papeles esenciales en la propagación de virus o bacterias, pero que no son producidas por las células del cuerpo. Janeway llamó a tales sensores *receptores de reconocimiento de patrón* (o *PRR*). En las últimas dos décadas, se han identificado varias familias de PRR, la más importante es la de los **receptores tipo Toll (TLR)**, el único grupo que se tratará en este capítulo. El descubrimiento de los TLR se produjo a través de una serie de eventos interesantes e inesperados.

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es bien conocida por su estatus icónico en el campo de la genética y también por las contribuciones que a través de ella se han hecho en el estudio y desarrollo de la neurobiología. Pero, al ser un invertebrado, la *Drosophila* no se había considerado un organismo probable para un descubrimiento importante sobre el funcionamiento del sistema inmune humano. Sin embargo, en 1996, Jules Hoffmann y sus colegas en Francia identificaron una mosca de la fruta mutante que era muy susceptible a las infecciones fúngicas, como se ilustra en la imagen de la **FIGURA 17-3**. La mosca representada en esa figura carece de una proteína llamada Toll, que ha sido identificada previamente como una proteína necesaria para el desarrollo normal de la polaridad dorsoventral ("superior-inferior") del embrión de la mosca. Además, encontraron que Toll actuó en las moscas a través de una vía que implica el factor de transcripción NF-κB, que era conocido por ser un elemento clave en la activación de una respuesta inmune en los vertebrados. Parece que Toll cumple una doble función en las moscas, como director de la polaridad embrionaria y como factor que promueve la inmunidad innata ante una infección.

El descubrimiento del gen *Toll* como un importante contribuyente al sistema de defensa de la mosca de la fruta llevó a Janeway

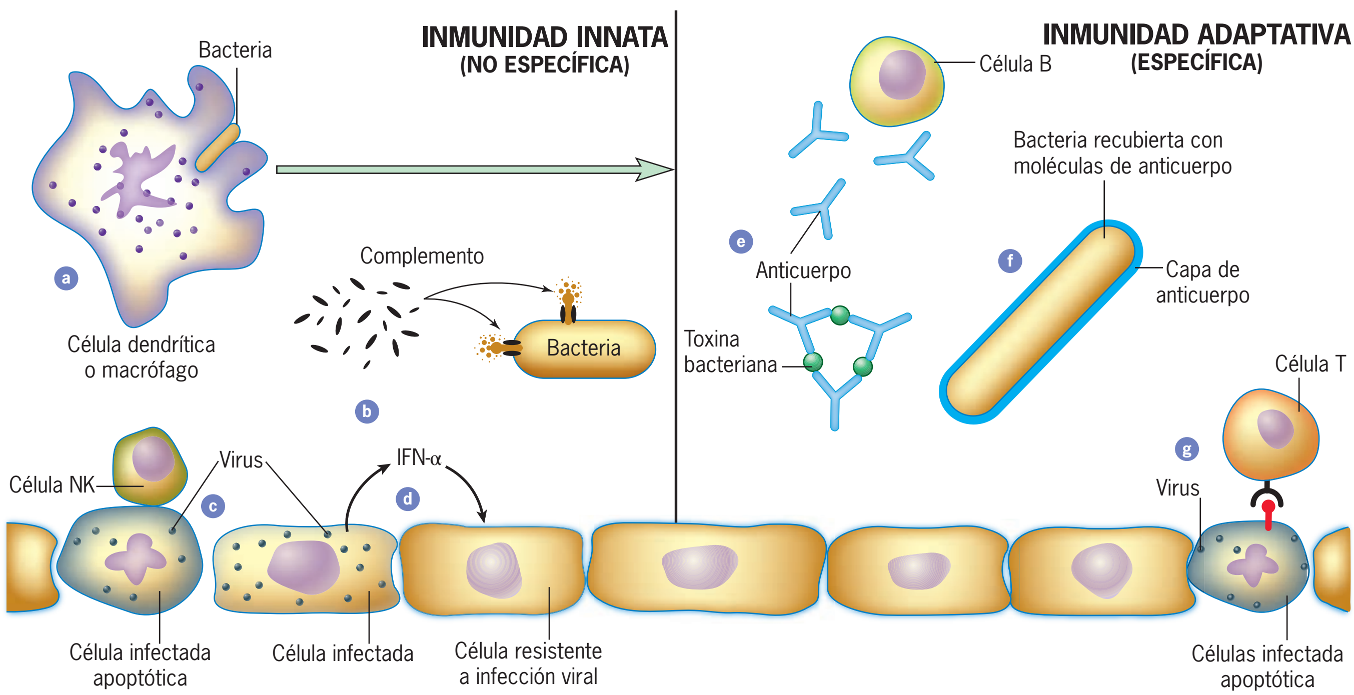



**FIGURA 17-2 Visión general de algunos de los mecanismos a través de los cuales el sistema inmune libera al cuerpo de patógenos invasores.** El panel izquierdo representa varios tipos de inmunidad innata: *a*) fagocitosis de una célula bacteriana; *b*) destrucción de células bacterianas por complemento; c) apoptosis inducida en una célula infectada por una célula asesina natural (NK), y *d*) inducción de resistencia viral por el interferón alfa (IFN-alfa). El panel de la derecha muestra varios tipos de inmunidad adaptativa: e) célula B produciendo anticuerpos que neutralizan una toxina bacteriana; *f* ) célula bacteriana recubierta con anticuerpo (opsonizado), que la hace susceptible a la fagocitosis o muerte inducida por complemento, y *g*) apoptosis inducida en una célula infectada por un linfocito T activado (célula T). Las respuestas inmunes innatas y adaptativas están vinculadas entre sí (flecha verde horizontal) debido a que las células, como las células dendríticas y los macrófagos, que fagocitan los patógenos, usan las proteínas extrañas para estimular la producción de anticuerpos específicos y células T dirigidas contra el patógeno. Las células NK también producen sustancias (p; ej. IFN-γ) que influyen en la respuesta de las células T.

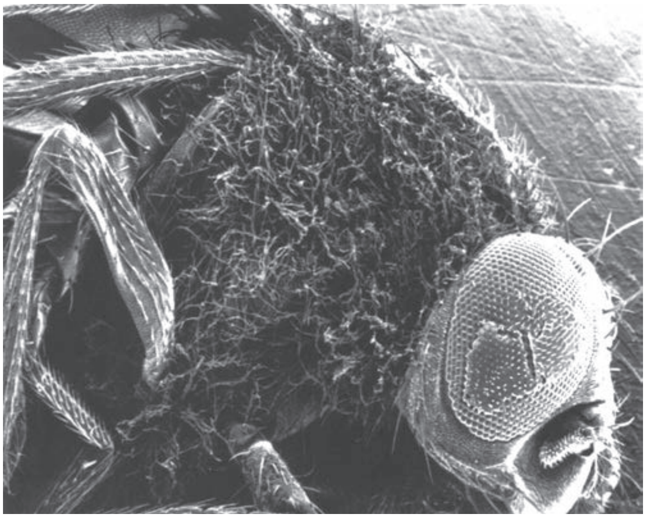


**FIGURA 17.3 Microfotografía electrónica de barrido de una mosca de la fruta mutante que ha muerto por una infección fúngica.** El cuerpo está cubierto de hifas fúngicas en germinación. Este individuo era susceptible a la infección porque carecía de un gen *Toll* funcional.

FUENTE: De Bruno Lemaitre *et al*., Cell 86:978, 1996, con permiso de Elsevier. Cortesía de Jules A. Hoffmann.

y su colega Ruslan Medzhitov a clonar y caracterizar un homólogo humano de la proteína Toll. Además, encontraron que el homólogo humano Toll también actuó a través de la vía NF-κB, induciendo la expresión de un número de proteínas efectoras inmunológicas (llamadas citocinas). Sin embargo, no se sabía qué papel específico desempeñaba este "Toll humano" en la respuesta inmune. Mientras tanto, Bruce Beutler y sus colegas del (Southwestern Medical Center), Centro Médico del Suroeste, en la Universidad de Texas, buscaban genes de mamíferos involucrados en el reconocimiento de componentes bacterianos, particularmente un componente de la membrana externa de bacterias gramnegativas, llamado lipopolisacárido (LPS). Descubrieron que una cepa de ratón que no podía responder al LPS carecía de un gen particular que codificaba un receptor de LPS. Sorprendentemente, este receptor de LPS fue el mismo homólogo de Toll (TLR4) que había sido caracterizado por Janeway y Medzhitov, definiendo así su papel como sensor bacteriano específico. Como sucede, los humanos expresan al menos 10 TLR funcionales, los cuales son proteínas transmembrana que se encuentran en una variedad de células. Los TLR pueden estar presentes ya sea en la superficie de la célula (donde interactúan con los microbios extracelulares) o dentro de las membranas endosómicas/lisosomales (donde interactúan con los microbios endocitositosados). Dentro de la familia de TRL humana se encuentran los TLR que reconocen los componentes lipopolisacáridos o peptidoglucanos de la pared celular bacteriana, la proteína flagelina que se encuentra en los flagelos bacterianos, el RNA de doble cadena característico de virus replicantes y dinucleótidos CpG no metilados (que son característicos del DNA bacteriano). En la **FIGURA 17-4** se muestra un modelo de un TLR unido a su ligando de RNA de doble cadena.

La activación de un TLR por una de estas moléculas derivadas de patógenos inicia una cascada de señales dentro de la célula que puede conducir a una variedad de respuestas inmunes protectoras incluyendo la activación de las células del sistema inmune adaptativo (representado por la flecha verde horizontal en la figura 17-2). Por esta razón, varias compañías farmacéuticas están trabajando en fármacos que estimulan los TLR con el objetivo de mejorar la respuesta del cuerpo contra las infecciones persistentes, como la causada por el virus de la hepatitis C. El Aldara, que se aprobó en 1997 y se receta para una serie de afecciones de la piel, incluidas las verrugas genitales, fue descubierto posteriormente por actuar estimulando un TLR.

Las respuestas innatas a los patógenos invasores suelen ir acompañadas de un proceso de **inflamación** en el lugar de la infección, donde determinadas células y proteínas plasmáticas salen de los vasos sanguíneos y penetran en los tejidos afectados (véase sección 7.8). Estos eventos son acompañados por enrojecimiento local, hinchazón y fiebre. La inflamación proporciona un medio para concentrar los agentes de defensa del cuerpo en el sitio donde son necesarios. Durante la inflamación, las células fagocíticas migran hacia un sitio de infección en respuesta a las sustancias químicas (quimioatrayentes) liberadas en el sitio (véase sección 9.14). Una vez allí, estas células reconocen, engullen y destruyen el patógeno (véase figura 17-2*a*). La inflamación es una espada de doble filo. Aunque protege al cuerpo contra un patógeno invasor, si la inflamación no finaliza de manera oportuna, puede llevar a daño de los tejidos normales del cuerpo y enfermedades crónicas. La regulación de la inflamación es un proceso complejo y poco comprendido que involucra un equilibrio entre las actividades pro y antiinflamatorias.

Otros mecanismos también están anclados para atacar patógenos extracelulares. Tanto las células epiteliales como los linfocitos secretan una variedad de péptidos antimicrobianos, llamados *defensinas*, que pueden unirse a virus, bacterias u hongos y provocar su muerte. La sangre también contiene un grupo de proteínas solubles llamado **complemento** que se une a los patógenos, lo que desencadena su destrucción. En una de las vías del complemento, un conjunto activado de estas proteínas perfora la membrana plasmática de una célula bacteriana, lo que conduce a la lisis celular y la muerte (véase figura 17-2*b*).

Las respuestas innatas contra los patógenos intracelulares, como los virus, se dirigen principalmente contra las células que

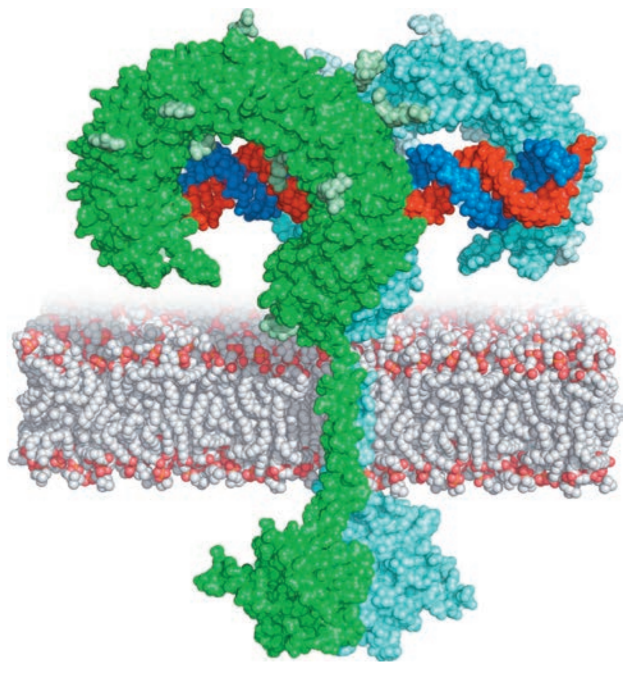


**FIGURA 17-4 Modelo de un receptor tipo Toll (TLR3) unido a una molécula de RNA de doble cadena (dsRNA).** Los dominios extracelulares para la unión del ligando de los TLR contienen una gran superficie curva compuesta principalmente de repeticiones ricas en leucina que proporcionan flexibilidad en la unión al ligando. El ligando de dsRNA (doble hélice azul y naranja) se une a un dímero de TLR cuyos dominios transmembranales y citoplásmicos se ponen en contacto cercano como se muestra en este modelo. El complejo está "listo" para enviar una señal intracelular que alerta a la célula de la presencia de la molécula de ácido nucleico extraña.

FUENTE: De Lin Liu *et al*., Cortesía de David R. Davies, *Science* 320: 381,2008; © 2008.Impreso con permiso de AAAS.

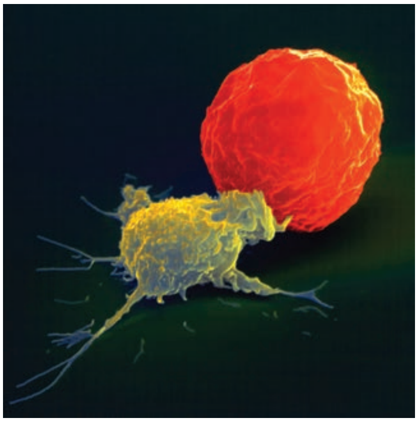


**FIGURA 17-5 Inmunidad innata.** Microfotografía electrónica de escaneo seudocoloreada de una célula asesina natural (amarilla) unida a una célula diana (naranja). Las células NK matan a sus objetivos por un mecanismo similar al descrito para los CTL en la Sección 17.6.

FUENTE: Eye of Science/Science Source.

ya están infectadas. Las células infectadas con ciertos virus son reconocidas por un tipo de linfocito no específico llamado **célula asesina natural** o Natural Killer (NK, por sus siglas en inglés). Como su nombre lo indica, las NK actúan causando la muerte de la célula infectada (véase figura 17-2*c*), pues la induce a sufrir apoptosis (véase sección 15.17). Las células NK también pueden matar ciertos tipos de células cancerosas *in vitro* (véase **FIGURA 17-5**) y proporcionar un mecanismo para destruir dichas células *in vivo* antes de que se conviertan en un tumor. Las células normales (es decir, no infectadas y no malignas) poseen moléculas de superficie que las protegen del ataque de las células asesinas.

Otro tipo de respuesta antiviral innata se inicia dentro de la propia célula infectada. Las células infectadas por el virus producen proteínas llamadas *interferones* tipo 1 (IFN-α e IFN-β) que se secretan en el espacio extracelular, donde se unen a la superficie de las células no infectadas haciéndolas resistentes a la infección posterior (véase figura 17-2*d*). Los interferones logran esto por varios medios, incluida la activación de una vía de transducción de señales que da como resultado la fosforilación y la consiguiente inactivación del factor de traducción eIF2 (véase página 443). Las células que han experimentado esta respuesta no pueden sintetizar las proteínas virales que se requieren para la replicación del virus. IFN-β también puede inducir la síntesis de microRNA celulares que se dirigen a genomas de RNA viral.

El sistema inmune innato y adaptativo no funcionan de manera independiente, sino que trabajan en estrecha colaboración para destruir un invasor extraño. La dependencia de las respuestas inmunes adaptativas a eventos previos orquestados por células del sistema innato fue un principio importante de la hipótesis original de Janeway (véase página 663). Más importante, las mismas células fagocíticas y células NK que llevan a cabo una respuesta innata inmediata también son responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa mucho más lenta y más específica. Como veremos a continuación, son las células no específicas del sistema innato las responsables de activar solo aquellas células específicas del sistema adaptativo que son capaces de lidiar con la amenaza particular que está presente.

## Respuestas inmunes adaptativas

A diferencia de las respuestas innatas, las **respuestas inmunes adaptativas** requieren un periodo lento durante el cual el sistema inmune se prepara para un ataque contra un agente extraño. A diferencia de las respuestas innatas, las respuestas inmunes adaptativas son altamente específicas y pueden discriminar entre dos moléculas muy similares. Por ejemplo, la sangre de una persona que acaba de recuperarse del sarampión contiene anticuerpos que reaccionan con el virus que causa el sarampión, pero no con un virus relacionado, como el que causa las paperas. A diferencia del sistema innato, el sistema adaptativo también tiene una "memoria", que generalmente significa que la persona no volverá a sufrir del mismo patógeno más adelante en su vida.

Mientras que todos los animales poseen algún tipo de inmunidad innata contra microbios y parásitos, solo se sabe que los vertebrados desarrollan una respuesta adaptativa. Hay dos amplias categorías de inmunidad adaptativa:

- **Inmunidad humoral**, que se lleva a cabo por **anticuerpos** (véase figura 17-2*e,f*). Los anticuerpos son proteínas globulares, transportadas por la sangre, de la **superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF)**.
- **Inmunidad mediada por células** la cual se lleva a cabo por diversos leucocitos como macrófagos y linfocitos T cooperadores 1 (Th1 por sus siglas en inglés) (véase figura 17-2*g*).

Ambos tipos de inmunidad adaptativa están mediados por **linfocitos**, que son leucocitos nucleados (glóbulos blancos) que circulan entre la sangre y los órganos linfoides. La inmunidad humoral está mediada por **linfocitos B (o células B)** que, cuando se activan, se diferencian en células que secretan anticuerpos. Los anticuerpos se dirigen principalmente contra materiales extraños que se encuentran fuera de las células del cuerpo. Dichos materiales incluyen la proteína y los componentes polisacáridos de las paredes de las células bacterianas, toxinas bacterianas y proteínas de la cubierta viral. En algunos casos, los anticuerpos se pueden unir a una toxina bacteriana o partícula de virus e impedir directamente que el agente ingrese a una célula hospedera (véase figura 17-2*e*). En otros casos, los anticuerpos funcionan como "etiquetas moleculares" que se unen a un patógeno invasor y lo marcan para su destrucción. Las células bacterianas recubiertas con moléculas de anticuerpos (véase figura 17-2*f*) son ingeridos rápidamente por fagocitos ambulantes o destruidos por moléculas de complemento transportadas en la sangre. Los anticuerpos no son efectivos contra los patógenos presentes dentro de las células, de ahí la necesidad de un segundo tipo de sistema de armas. La inmunidad mediada por células es llevada a cabo por **linfocitos T** (o **células T**) que, cuando se activan, pueden reconocer y matar específicamente a una célula infectada (o extraña) (véase figura 17-2*g*).

Las células B y T surgen del mismo tipo de célula precursora (una *célula madre hematopoyética*) en la médula ósea, pero se diferencian a lo largo de distintas vías en diferentes órganos linfoides. Un resumen de las diversas vías de diferenciación de la célula madre hematopoyética se muestran en la **FIGURA 17-6**. Los linfocitos B se diferencian en el hígado fetal o en la médula ósea adulta, mientras que los linfocitos T se diferencian en la glándula del timo, un órgano ubicado en el pecho que alcanza su tamaño máximo durante la infancia. Debido a estas diferencias, la inmunidad humoral mediada por células puede disociarse en gran medida. Por ejemplo, los humanos pueden sufrir una rara enfermedad conocida como agammaglobulinemia congénita en la que el anticuerpo humoral es deficiente y la inmunidad mediada por células es normal.

### REPASO

1. Compare las propiedades generales de las respuestas inmunes innatas y adaptativas.
2. Enumere cuatro tipos de respuestas inmunes innatas. ¿Cuál sería más eficaz contra un patógeno dentro de una célula infectada?
3. ¿Qué significan los términos "inmunidad humoral" y "mediada por células"?

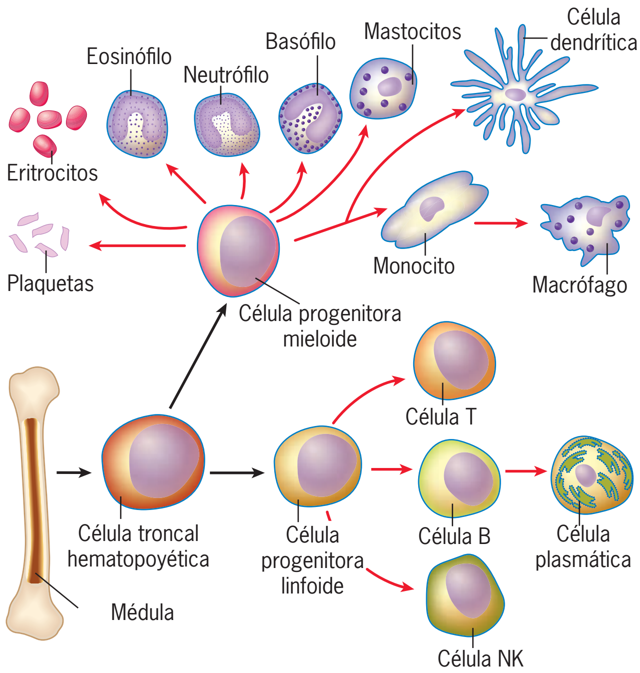



**FIGURA 17-6 Vías de diferenciación de una célula troncal hematopoyética de la médula ósea.** Una célula troncal hematopoyética puede dar lugar a dos células progenitoras diferentes: una célula progenitora mieloide que puede diferenciarse en la mayoría de las diversas células sanguíneas (p. ej., eritrocitos, basófilos y neutrófilos), macrófagos o células dendríticas; o una célula progenitora linfoide que puede diferenciarse en cualesquiera de los diversos tipos de linfocitos (células NK, células T o células B). Los precursores de células T migran al timo donde se diferencian en células T maduras. Por el contrario, las células B sufren diferenciación en la médula ósea. Las células en las diversas etapas de diferenciación de células B y T se pueden distinguir por las especies de proteínas en su superficie celular y/o los factores de transcripción que determinan los genes que deben ser expresados.

## 17.2 La teoría de la Selección Clonal aplicada a las células B

Si una persona está infectada con un virus o expuesta a material extraño, su sangre pronto contendrá una alta concentración de anticuerpos capaces de reaccionar con la sustancia extraña, los mismos se conocen como **antígenos**. La mayoría de los antígenos son proteínas o polisacáridos, pero los lípidos y los ácidos nucleicos también pueden poseer esta capacidad. ¿Cómo puede el cuerpo producir anticuerpos que reaccionan *específicamente* con un antígeno al que está expuesto? En otras palabras, ¿cómo un antígeno induce una respuesta inmune adaptativa? Inicialmente, se pensó que los antígenos, de alguna manera, *instruían* a los linfocitos para producir anticuerpos complementarios. Se sugirió que un antígeno se envuelve a sí mismo alrededor de una molécula de anticuerpo, moldeando el anticuerpo en una forma capaz de combinarse con ese antígeno particular. En este modelo "instructivo", el linfocito solo adquiere su capacidad de producir un anticuerpo específico después de su contacto inicial con el antígeno. En 1955, Niels Jerne, un inmunólogo danés, propuso un mecanismo radicalmente diferente. Jerne sugirió que el cuerpo produce pequeñas cantidades de anticuerpos estructurados aleatoriamente en ausencia de antígenos. Como grupo, estos anticuerpos podrían combinarse con cualquier tipo de antígeno al que una persona pueda estar expuesta en algún momento. De acuerdo con el modelo de Jerne, cuando una persona está expuesta a un antígeno, este se combina con un anticuerpo específico, que conduce a la producción posterior de la molécula de ese anticuerpo particular. Así, en el modelo de Jerne, el antígeno *selecciona* a aquellos anticuerpos preexistentes capaces de unirse a ella. En 1957, el inmunólogo australiano F. MacFarlane Burnet amplió el concepto de selección antigénica de anticuerpos a un modelo integral de formación de anticuerpos. La **teoría de selección clonal** de Burnet rápidamente ganó amplia aceptación. En la **FIGURA 17-7** se muestra una descripción general de los pasos que ocurren durante la selección clonal de células B. Un

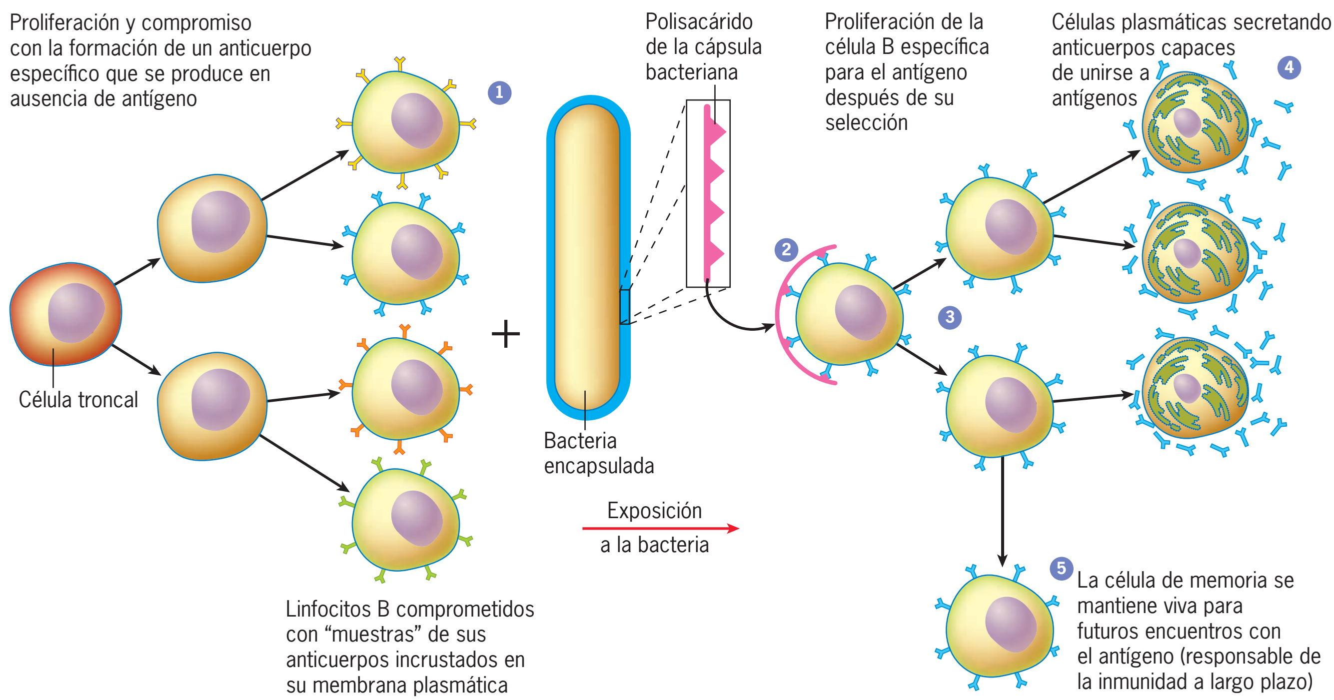



**FIGURA 17-7 La selección clonal de células B por un antígeno independiente del timo.** Los pasos se exponen en la figura y también se analizan en el texto.

análisis más detallado de estos eventos se proporciona más adelante en el capítulo. La selección clonal de células T se describe en la siguiente sección. Las principales características de la selección clonal de células B son la siguientes:

1. ***Cada célula B se compromete a producir una especie de anticuerpo.*** Las células B surgen de una población de células progenitoras indiferenciadas e indistinguibles. A medida que se diferencia, una célula B se compromete como resultado de reordenamientos del DNA (véase figura 17-8) para producir solo una especie de molécula de anticuerpo (véase figura 17-7, paso 1). Miles de diferentes reordenamientos de DNA son posibles, de modo que diferentes células B producen distintas moléculas de anticuerpos. Por tanto, aunque las células B maduras parecen idénticas bajo el microscopio, pueden distinguirse por los anticuerpos que producen.
2. ***Las células B se comprometen en la formación de anticuerpos en ausencia de antígeno.*** El repertorio básico de células productoras de anticuerpos que una persona poseerá a lo largo de su vida ya está presente en los tejidos linfoides *antes de la estimulación por un antígeno* y es independiente de la presencia de materiales extraños. Cada célula B presenta su anticuerpo particular en su superficie con la parte reactiva antigénica orientada hacia afuera. Como resultado, la célula está recubierta con receptores antigénicos que pueden unirse específicamente con antígenos que tienen una estructura complementaria. Aunque la mayoría de las células linfoides nunca se requiere durante la vida de una persona, el sistema inmunitario está preparado para responder inmediatamente a cualquier antígeno al que pueda estar expuesta una persona. La presencia de células con diferentes anticuerpos unidos a la membrana puede demostrarse experimentalmente, como se ve en la **FIGURA 17-8**.
3. ***La producción de anticuerpos se lleva a cabo despúes de la selección de células B por el antígeno.*** En la mayoría de los casos, la activación de una célula B por antígeno requiere la participación de células T (descritas en la figura 17-12 y en la página 689). Sin embargo, algunos antígenos, como los polisacáridos presentes en las paredes de las células bacterianas, activan las células B por sí mismos; antígenos de este tipo se describen como *antígenos timo-independientes*. Para una mejor ilustración del tema, dedicaremos el análisis en este punto del capítulo a un antígeno timo-independiente. Supongamos que una persona estuviera expuesta a *Haemophilus influenzae* tipo B, una bacteria capsulada que puede causar meningitis fatal. La cápsula de estas bacterias contiene un polisacárido que se puede unir a una pequeña fracción de las células B del cuerpo (véase figura 17-7, paso 2). Las células B que se unen al polisacárido contienen anticuerpos unidos a la membrana cuyo sitio de combinación les permite interactuar de manera específica con ese antígeno. De esta forma, un antígeno *selecciona* aquellos linfocitos que producen anticuerpos capaces de interactuar con ese antígeno. La unión al antígeno activa la célula B, causando su proliferación (véase figura 17-7, paso 3) y forma una población (*o clon*) de linfocitos, que produce el mismo anticuerpo. Algunas de estas células activadas se diferencian en **células plasmáticas** de vida corta que secretan grandes cantidades de moléculas de anticuerpos (véase figura 17-7, paso 4). A diferencia de sus precursores de células B (véase **FIGURA 17-9*a***), las células plasmáticas poseen un extenso retículo endoplasmático rugoso característico de células especializadas en la síntesis y secreción de proteínas (véase figura 17-9*b*).
4. ***La memoria inmunológica proporciona inmunidad a largo plazo.*** No todos los linfocitos B que se activan por el antígeno diferencian células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Algunos permanecen en los tejidos linfoides como *células B de memoria* (véase figura 17-7, paso 5) que pueden responder rá-

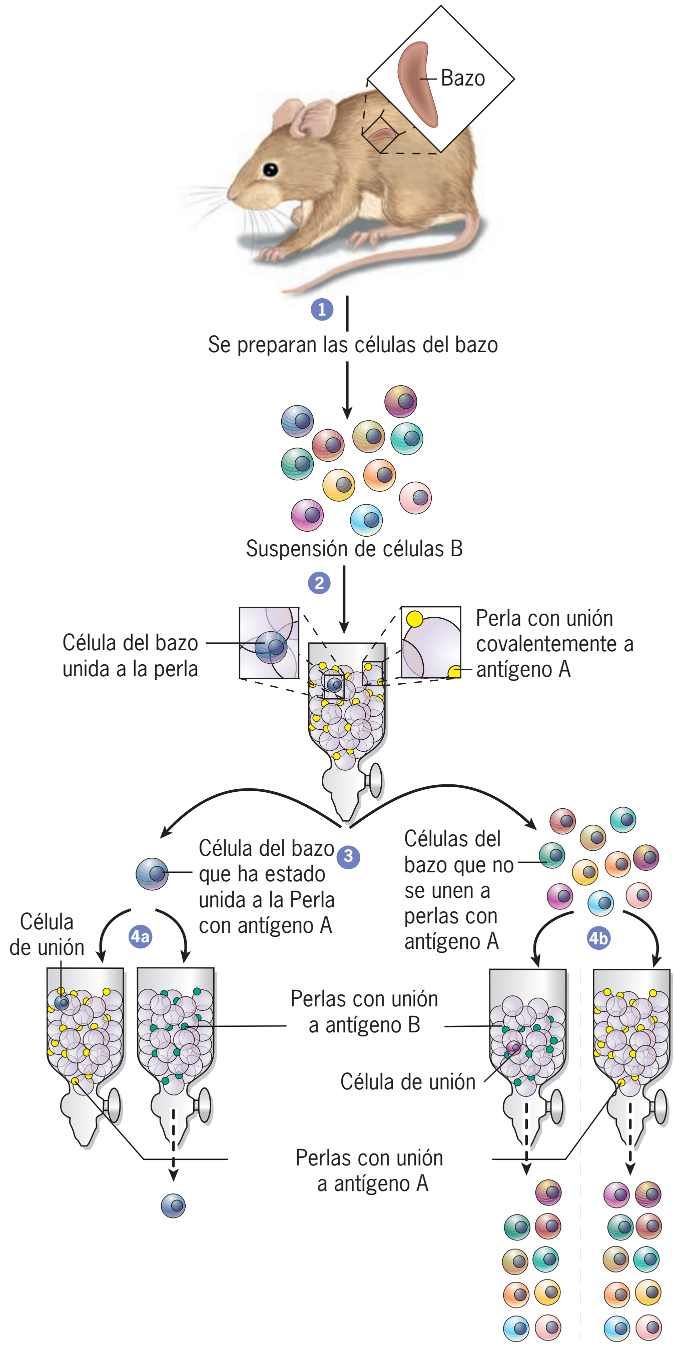
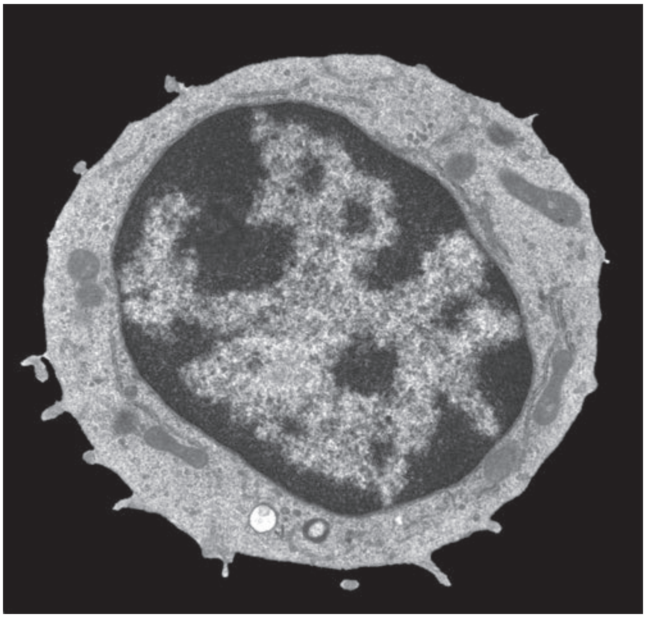
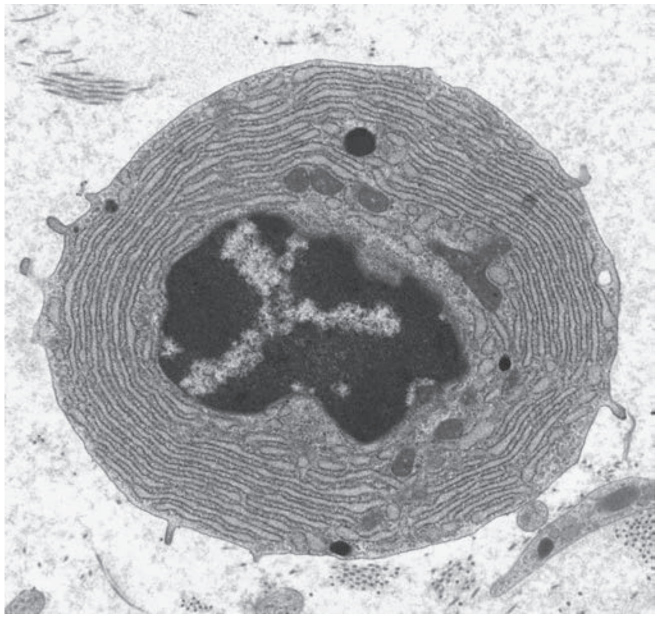



**FIGURA 17-8 Demostración experimental de que diferentes células B contienen un anticuerpo distinto unido a la membrana y que estos anticuerpos se producen en ausencia de antígeno.** En este experimento, las células B están preparadas a partir de un bazo de ratón (etapa 1). En la etapa 2, las células del bazo pasan a través de una columna que contiene perlas recubiertas con un antígeno (antígeno A) al que el ratón nunca había sido expuesto. Una pequeña fracción de las células del bazo se une a las perlas, mientras que la gran mayoría de las células del bazo pasa directamente a través de la columna (que se muestra en la etapa 3). En la etapa 4, las células del bazo del experimento anterior pasan a través de una de dos columnas diferentes: una columna cuyas perlas están recubiertas con antígeno A o una columna cuyas perlas están recubiertas con un antígeno no relacionado (antígeno B) al que el ratón nunca había sido expuesto. En la etapa 4a, las células del bazo probadas son aquellas que se habían unido a las perlas en el paso anterior. Se descubrió que estas células se volvieron a unir a las perlas recubiertas con el antígeno A, pero no se unen a las perlas recubiertas con el antígeno B. En la etapa 4b, las células del bazo probadas son aquellas que no se unieron a las perlas en la etapa anterior. Ninguna de estas células se une a las perlas recubiertas con el antígeno A, pero una pequeña fracción se une a las perlas recubiertas con el antígeno B.



*a*)



*b*)

**FIGURA 17-9 Comparación de la estructura de una célula B *a*) y una célula plasmática *b*).** La célula plasmática tiene un compartimiento citoplásmico mucho más grande que la célula B, con más mitocondrias y un retículo endoplásmico rugoso desarrollado extensivamente. Estas características reflejan la síntesis de un gran número de moléculas de anticuerpos por parte de la célula plasmática.

FUENTE: Steve Gschmeissner/Photo Researchers, Inc.

pidamente en un encuentro posterior si el antígeno reaparece en el cuerpo. Aunque las células plasmáticas mueren después de la eliminación del estímulo antigénico, las células B de memoria pueden perdurar durante toda la vida de una persona. Se ha demostrado, por ejemplo, que las personas mayores que vivieron durante la pandemia de influenza de 1918 todavía contienen células B circulantes que son específicas para el patógeno al que estuvieron expuestos 90 años antes. Cuando se estimulan por el mismo antígeno, algunas de las células B de memoria proliferan rápidamente en células plasmáticas, generando una *respuesta inmune secundaria* en cuestión de horas en lugar de los días necesarios para la respuesta original (véase la figura 17-13).

5. ***La tolerancia inmunológica evita la producción de anticuerpos hacia sí mismo.*** Como se analiza a continuación, los genes que codifican anticuerpos se generan mediante un proceso en el que los segmentos de DNA se combinan aleatoriamente. Como resultado, se forman de modo invariable genes que codifican anticuerpos que pueden reaccionar con los propios tejidos del cuerpo, lo que podría producir la destrucción generalizada del órgano y la enfermedad posterior. Obviamente, lo mejor para el cuerpo es prevenir la producción de tales proteínas, las cuales son llamadas **autoanticuerpos**. A medida que se desarrollan, muchas de las células B capaces de producir autoanticuerpos se destruyen o se vuelven inactivas. Como resultado, el cuerpo desarrolla una *tolerancia inmunológica* hacia sí mismo. Como se analiza en Perspectiva humana (sección 17-3) una rotura del estado tolerante puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes debilitantes.

Varios principios de la teoría de la selección clonal se pueden ilustrar al considerar brevemente el tema de la vacunación.

## REPASO

1. Compare los mecanismos instructivos y selectivos de producción de anticuerpos.
2. ¿Cuáles son los principios básicos de la teoría de la selección clonal?
3. ¿Qué significa para una célula B comprometerse a la formación de anticuerpos? ¿Cómo es influido este proceso por la presencia de antígeno? ¿Qué papel desempeña el antígeno en la producción de anticuerpos?
4. ¿Qué significan los términos ***memoria inmunológica*** y ***tolerancia inmunológica***?

# 17.3 PERSPECTIVA HUMANA

## Enfermedades autoinmunes

El sistema inmune requiere interacciones complejas y altamente específicas entre muchos tipos diferentes de células y moléculas. Numerosos eventos deben tener lugar antes de que se pueda iniciar una respuesta inmune humoral o mediada por células, lo que hace que estos procesos sean vulnerables a la alteración en varias etapas por numerosos factores. Entre los diversos tipos de disfunción inmune están incluidas las **enfermedades autoinmunes**, que se producen cuando el cuerpo pone en práctica una respuesta inmune contra una parte de sí mismo. Se han caracterizado más de 80 enfermedades autoinmunes diferentes, que afectan aproximadamente al 5% de la población.

Debido a que la especificidad de los receptores de antígenos de las células T y B está determinada por un proceso de reordenamiento genético aleatorio, es inevitable que algunos miembros de estas poblaciones celulares posean receptores dirigidos contra las propias proteínas del cuerpo (*autoantígenos*).

Linfocitos que se unen a sí mismos tienden a ser eliminados de la población de linfocitos, haciendo al sistema inmune *tolerante* hacia sí mismo. Sin embargo, algunos de los linfocitos autorreactivos generados en el timo y la médula ósea escapan a los procesos de selección negativa del cuerpo, obteniendo el *potencial* para atacar los tejidos corporales normales. La presencia de linfocitos B y T capaces de reaccionar contra los tejidos del cuerpo se demuestran fácilmente en individuos sanos. Por ejemplo, cuando las células T se aíslan de la sangre y se tratan *in vitro* con una proteína propia normal, junto con la citocina IL-2, es probable que prolifere un pequeño número de células en la población para formar un clon de células que pueden reaccionar ante ese autoantígeno. Del mismo modo, si los animales de laboratorio son inyectados con una proteína propia purificada junto con un *adyuvante*, que es una sustancia no específica que potencia la respuesta al antígeno inyectado, crean una respuesta inmune contra los tejidos en los que normalmente se encuentra esa proteína. Bajo circunstancias normales, las células B y T capaces de reaccionar a los autoantígenos son inhibidas por células $T_{Reg}$ específicas a antígeno (véase página 678) o por otros mecanismos supresores. Cuando estos mecanismos fallan, una persona puede sufrir una enfermedad autoinmune, incluidas las que se describen a continuación.

1. **La esclerosis múltiple** (MS) es una enfermedad inflamatoria crónica que generalmente ataca a adultos jóvenes, causando daño neurológico grave y a menudo progresivo. La MS es el resultado de un ataque de células inmunes y/o anticuerpos contra la vaina de mielina que rodea los axones de las células nerviosas (véase figura 4.5). Estas envolturas forman la sustancia blanca del sistema nervioso central. La desmielinización de los nervios que es resultado de este ataque inmunológico interfiere con la conducción de los impulsos nerviosos a lo largo de los axones, provocando en el individuo disminución de la vista, problemas con la coordinación motriz y alteraciones en la percepción sensorial. Una enfermedad similar a la MS, llamada encefalomielitis alérgica experimental, puede inducirse en animales de laboratorio mediante inyección de proteína básica de mielina, uno de los principales componentes de la membrana plasmática de mielina. Sin embargo, se han planteado interrogantes sobre la validez de este y otros modelos de ratón de enfermedades autoinmunes humanas debido a que los agentes que han demostrado eficacia en el tratamiento de estos ratones afectados a menudo no se traducen en tratamientos efectivos para los humanos.
2. **La diabetes tipo 1** (T1D) generalmente se presenta en niños y es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β secretoras de insulina del páncreas. La destrucción de estas células está mediada por células T autorreactivas, cuya proliferación puede ser estimulada por una infección viral. En la actualidad, a los pacientes con T1D se les administran dosis diarias de insulina. Mientras que la hormona les permite sobrevivir, estos individuos aún pueden estar sujetos a enfermedades degenerativas renales, vasculares y de la retina. Los pacientes generalmente poseen una fracción significativa de sus células β (p. ej., 10-20%) en el momento en que se les diagnostica la enfermedad. Se espera que se puedan desarrollar tratamientos que detengan la pérdida adicional de estas células e incluso aumente su reproducción en el páncreas. Al igual que con la MS, un modelo de ratón muy estudiado para la T1D, llamado ratón NOD (diabético no obeso), a menudo se utiliza para probar fármacos en estudios preclínicos.
3. **La enfermedad de Graves** y la **tiroiditis** son enfermedades autoinmunes de la tiroides que producen síntomas muy diferentes. En la enfermedad de Graves, el objetivo del ataque inmune es el receptor de TSH en la superficie de las células tiroideas que normalmente se unen a la hormona estimulante de la hormona pituitaria tiroidea (TSH). En los pacientes con esta enfermedad, los autoanticuerpos se unen al receptor de TSH, lo cual genera la estimulación prolongada de las células tiroideas, provocando hipertiroidismo (es decir, niveles elevados de hormona tiroidea en la sangre). La tiroiditis (o tiroiditis de Hashimoto) se desarrolla a partir de un ataque inmune contra una o más proteínas comunes de las células tiroideas, incluida la tiroglobulina. La destrucción resultante de la glándula tiroides conduce a hipotiroidismo (es decir, disminución de los niveles sanguíneos de la hormona tiroidea).
4. **La artritis reumatoide** afecta aproximadamente al 1% de la población y se caracteriza por la destrucción progresiva de las articulaciones del cuerpo debido a una cascada de respuestas inflamatorias. En una articulación normal, la membrana sinovial que recubre la cavidad sinovial es solo una capa de células de grosor. En personas con artritis reumatoide, esta membrana se inflama y engrosa debido a la infiltración de células inmunitarias autorreactivas y/o autoanticuerpos en la articulación. Con el tiempo, el cartílago es reemplazado por tejido fibroso, lo que provoca la inmovilización de la articulación.
5. **El lupus eritematoso sistémico** (SLE) recibe su nombre de “lobo rojo” por una erupción rojiza que se desarrolla en las mejillas durante las primeras etapas de la enfermedad (véase **FIGURA 1**). A diferencia de otras enfermedades autoinmunes analizadas anteriormente, el SLE rara vez se confina a un órgano en particular, sino que a menudo ataca los tejidos de todo el cuerpo, incluidos el sistema nervioso central, los riñones y el corazón. El suero de pacientes con SLE contiene anticuerpos dirigidos contra una serie de componentes que se encuentran en el núcleo de las células, incluidas las pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP); proteínas de los centrómeros de los cromosomas, y, más notablemente, DNA de doble cadena. Estudios recientes sugieren que la autoinmunidad ocurre cuando los TLR que normalmente reconocen el DNA y el RNA microbianos (véase página 664) se unen por error a las macromoléculas informativas propias del cuerpo. La incidencia de SLE es particularmente alta en mujeres en edad fértil, lo que sugiere una función de las hormonas femeninas en el desencadenamiento de la enfermedad.
6. **Las enfermedades inflamatorias del intestino** (IBD), como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, se caracterizan por inflamación dolorosa del intestino. La acumulación de evidencia sugiere que estas condiciones son el resultado de una respuesta inapropiada por el sistema inmune a las bacterias comensales normales que habitan en nuestro sistema digestivo. Los estudios de asociación de genoma completo (véase página 400) han vinculado más de 50 *loci* genéticos con susceptibilidad a estas enfermedades.

No todas las personas en la población son igualmente susceptibles a desarrollar una de estas enfermedades autoinmunes. La mayoría de estos trastornos aparecen con más frecuencia en ciertas familias que en la población general, lo que indica un




**FIGURA 1** Una erupción “mariposa” que aparece con frecuencia como uno de los primeros síntomas del SLE.
FUENTE: American College of Rheumatology.

(*continúa*)

fuerte componente genético para su desarrollo. Aunque se ha demostrado que muchos genes diferentes aumentan la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, aquellos que codifican polipéptidos de MHC de clase II están más estrechamente vinculados. Por ejemplo, las personas que heredan ciertos alelos del *locus* del MHC son particularmente susceptibles a desarrollar diabetes tipo 1. Se cree que las células que portan moléculas MHC codificadas por los alelos sensibles pueden unirse a péptidos particulares que estimulan la formación de autoanticuerpos contra las células β secretoras de insulina del páncreas. Otros *loci* que están correlacionados con un mayor riesgo de enfermedades autoinmunes incluyen genes que codifican proteínas implicadas en las vías de señalización de las células T, como la proteína tirosina fosfatasa PTPN22 y los genes que codifican ciertas citocinas proinflamatorias o sus receptores.

La posesión de alelos de alto riesgo puede ser necesaria para un individuo para desarrollar ciertas enfermedades autoinmunes, pero no es el único factor contribuyente. Los estudios de gemelos idénticos indican que, si un gemelo desarrolla una enfermedad autoinmune, la probabilidad de que el otro gemelo también desarrolle la enfermedad oscila entre 25 y 75%, no 100% como se esperaba si la genética fuera el único factor contribuyente. Identificar los factores ambientales o epigenéticos específicos (véase sección 12.7) que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades ha demostrado ser aún más elusivo que la identificación de los genes predisponentes.

El gran progreso que se ha logrado en las últimas dos décadas en nuestra comprensión de las bases celulares y moleculares de la inmunidad ha llevado a nuevos tratamientos para una serie de enfermedades autoinmunes que involucran la manipulación del sistema inmune del cuerpo. Estos tratamientos han sido probados en modelos animales (que pueden desarrollar enfermedades similares a los humanos) y su seguridad y eficacia determinadas en pruebas clínicas en humanos. Entre los enfoques tomados están:

- Terapia con fármacos inmunosupresores, como la ciclosporina A o CellCept, que bloquean la respuesta autoinmune. Los corticosteroides, como la prednisona, también se recetan por periodos cortos. Dado que estos fármacos son inespecíficos, inhiben todos los tipos de respuestas inmunes y, por tanto, hacen al paciente susceptible a infecciones peligrosas.
- Restauración de la tolerancia inmunológica hacia los autoantígenos para que el cuerpo deje de producir autoanticuerpos y células T autorreactivas. De todos los enfoques analizados en esta sección, este es el único que promete el potencial para la terapia antígena específica que se dirige a una población determinada de células inmunitarias autorreactivas; todos los demás ejercen una influencia inespecífica en el sistema inmune. Una forma de inducir tolerancia a antígenos específicos es administrar péptidos (denominados APL) semejantes a los péptidos que se generarían a partir de los autoantígenos responsables de causar la enfermedad. Se espera que tales APL se unan a los TCR de una manera subóptima, bloqueando la activación de las células T y reduciendo la secreción de citocinas inflamatorias (p. ej., TNF-α e IFN-α). Un fármaco de este tipo (Copaxona) consiste en una mezcla de péptidos sintéticos cuya estructura se parece a la de la proteína básica de mielina. La copaxona sigue siendo la única terapia específica de antígenos para enfermedades autoinmunes que ha sido aprobada hasta la fecha, pero varios tipos similares de péptidos “vacunas” se encuentran bajo pruebas clínicas. Mientras la copaxona puede reducir la frecuencia de recaídas en pacientes con esclerosis múltiple, no detiene la progresión de la enfermedad y puede provocar efectos secundarios alérgicos graves. Otro enfoque para inducir tolerancia inmunológica a proteínas derivadas de mielina en pacientes con MS ha sido aislar las células T autorreactivas del paciente, expandir su número en cultivo, hacerlas incapaces de replicarse e inyectarlas nuevamente al paciente con el objetivo de inducir una reacción inmune contra las células reintroducidas y otras autorreactivas en el cuerpo. Las pruebas de fase IIb de esta vacuna anti-células T específica para el paciente (Tovaxin o Tcelna) comenzaron en 2011 y arrojaron resultados prometedores. Otra forma de inducir tolerancia inmunológica es administrar una versión modificada de la proteína CTLA4, la cual se une a la proteína coestimulante B7 en la superficie de APC e inhibe la capacidad de estas células para activar las células T autorreactivas. Orencia, que actúa de esta manera, ha sido aprobado para pacientes con artritis reumatoide. Muchos investigadores creen que el mejor enfoque a largo plazo, el enfoque específico del antígeno para restablecer la tolerancia, es tratar al individuo con sus propias células $T_{Reg.}$ En este enfoque, las células $T_{Reg}$ deseadas se aislarían de la sangre del paciente, se dejaría proliferar extensivamente *in vitro*, y luego se reinyectarían de nuevo en un intento para suprimir las células inmunes autorreactivas específicas que están librando el ataque autoinmune. Varios análisis clínicos que implican la transferencia de células $T_{Reg}$ han comenzado en pacientes que están experimentando complicaciones inmunológicas después del trasplante de órganos.
- El bloqueo del efecto de las citocinas proinflamatorias, que se encuentran entre los agentes que causan la mayor destrucción tisular en muchas enfermedades autoinmunes. Los ejemplos mejor estudiados de este enfoque son los anticuerpos (p. ej., Remicade, Cimzia, Simponi y Humira) y una proteína de fusión recombinante (Enbrel) que actúan contra la citocina proinflamatoria TNF-α. Estos fármacos han sido aprobados para el tratamiento de la artritis reumatoide y pueden tener efectos curativos significativos en muchos pacientes. Al mismo tiempo, el bloqueo de la acción del TNF-α puede aumentar el riesgo de infecciones (incluyendo tuberculosis) y linfoma. La IL-1 es otra citocina proinflamatoria clave, y una cantidad de inhibidores de la IL-1 están presentes en el fármaco pipelina. Kineret, una proteína recombinante que bloquea la actividad de IL-1 uniéndose al receptor de IL-1, ha estado en uso durante más de una década para el tratamiento de la artritis reumatoide. Del mismo modo, un anticuerpo monoclonal humano (Stelara) dirigido contra IL-12 e IL-23 muestra eficacia contra la enfermedad de Crohn y la psoriasis.
- Tratamiento con citocinas. En la actualidad, el tratamiento más ampliamente prescrito para la esclerosis múltiple es una de varias citocinas IFN-β probadas (Avonex, Rebif, Extavia y Betaseron), que reducen la progresión de la enfermedad en un promedio de 35%. IFN-β tiene muchas actividades y se debate el mecanismo de acción preciso.
- Tratamiento con agentes que destruyen las células B o bloquean su activación. Aunque generalmente se cree que las enfermedades autoinmunes son el resultado de la disfunción de las células T, particularmente de las células T cooperadoras, existe considerable evidencia de que las células B autorreactivas tienen varias funciones que cumplir. Además de producir anticuerpos, las células B pueden servir como APC para células T específicas de antígeno, y secretan una variedad de citocinas. La importancia de las células B en los trastornos autoinmunes se ha confirmado en estudios clínicos con dos anticuerpos monoclonales (Rituxan y Arzerra) que se unen a las células B y las destruyen. El rituxan ha sido utilizado como un tratamiento seguro y exitoso para el linfoma (véase página 655), antes fue probado en pacientes con artritis reumatoide y esclerosis múltiple, donde ha demostrado ser muy eficaz. Es notable que, a pesar de que estos fármacos basados en anticuerpos virtualmente disminuyen la sangre de las células B circulantes durante un periodo de varios meses, no limitan la capacidad del paciente para iniciar respuestas inmunes contra agentes infecciosos. En 2011, se aprobó un anticuerpo (Benlysta) que inhibe indirectamente la producción de células B para el tratamiento del SLE, el primer fármaco nuevo aprobado para el tratamiento de la enfermedad en 50 años. Benlysta actúa dirigiéndose a BLyS, una proteína que estimula la proliferación y diferenciación de las células B, y proporciona beneficios a una fracción de los pacientes con SLE.

- Interrupción del movimiento de las células autorreactivas a las áreas de inflamación. El primer tratamiento efectivo basado en este concepto para ser aprobado por la FDA fue un anticuerpo monoclonal (Tysabri) que está dirigido contra la subunidad alfa-4 de las integrinas presentes en la superficie de las células T activadas. El fármaco tiene como objetivo evitar que estas células T crucen la barrera hematoencefálica (véase página 247) y atacar las vainas de mielina del sistema nervioso central de los pacientes con MS. Siempre existe la preocupación con cualquier tipo de terapia inmune de que el tratamiento interfiera con la capacidad del cuerpo para combatir la infección. Esta preocupación apareció cuando Tysabri se retiró temporalmente del mercado en 2005 después de que varios pacientes desarrollaran una infección cerebral viral grave (llamada PML). En la actualidad, Tysabri se prescribe ampliamente para tratar la MS, aunque el pequeño riesgo de contraer la PML sigue siendo una preocupación. En 2010, el primer fármaco para la MS que se podía tomar por vía oral, llamado Gilenya, fue aprobado por la FDA basado en su capacidad para reducir las recaídas y retrasar la progresión de la enfermedad. Al igual que Tysabri, Gilenya también bloquea la migración de células T pero lo hace por un mecanismo muy diferente. Gilenya es un pequeño compuesto sintético que, una vez fosforilado por el cuerpo, se une a los receptores de esfingosina 1-fosfato en la superficie de las células T, lo que provoca que los receptores se internalicen por endocitosis. Las células que carecen de los receptores de superficie no pueden responder a su ligando normal, lo que promovería su migración desde el timo y los ganglios linfáticos hacia el torrente sanguíneo, desde donde podrían alcanzar el sistema nervioso central. Otro fármaco oral para tratar la MS, llamado El Aubagio, fue aprobado en 2012. Aubagio es conocido como un inhibidor de la síntesis de pirimidina, y un compuesto relacionado se ha utilizado para tratar la artritis reumatoide. El mecanismo de acción actualmente no se comprende bien, pero parece actuar inhibiendo la expansión y la migración de las células T y B al CNS.
- Trasplante de células troncales hematopoyéticas (véase página 18) del paciente (un trasplante autólogo) o de un donante que sea lo bastante compatible (un trasplante alogénico). Debido a que este procedimiento puede causar complicaciones potencialmente mortales, representa un tratamiento solo para aquellos pacientes con enfermedad autoinmune grave y debilitante. Sin embargo, a diferencia de los fármacos descritos anteriormente, los receptores de trasplantes comienzan el resto de sus vidas con un sistema inmune significativamente transformado y la posibilidad de estar por completo curados de su enfermedad. Se estima que alrededor de un tercio de los receptores de trasplantes experimenta beneficios significativos del procedimiento a largo plazo, mientras que otro tercio no obtiene beneficio aparente en absoluto. Las razones de esta marcada discrepancia en la respuesta continúan sin esclarecerse.

## 17.4 Vacunación

Edward Jenner ejerció la medicina en el campo inglés en un periodo en que la viruela era una de las enfermedades más prevalentes y temidas. Con el paso de los años, se dio cuenta de que las empleadas que atendían a las vacas generalmente se libraban de los estragos de la enfermedad. Jenner concluyó que las lecheras eran, de algún modo, "inmunes" a la viruela porque eran infectadas a temprana edad con la viruela vacuna, una enfermedad inofensiva que habrían contraído de sus vacas. La viruela vacuna produce ampollas que se asemejan a las ampollas de viruela llenas de pus, pero las ampollas de la viruela bovina se localizan y desaparecen, sin causar nada grave más que una cicatriz en el lugar de la infección.

En 1796, Jenner realizó uno de los experimentos médicos más famosos (y arriesgados) de todos los tiempos. Primero, infectó a un niño de 8 años con viruela vacuna y le dio tiempo al niño para recuperarse. Seis semanas después, Jenner infectó intencionalmente al niño con viruela inyectándole pus de una lesión de viruela directamente debajo de la piel. El niño no mostró signos de la enfermedad mortal. En unos pocos años, miles de personas se volvieron inmunes a la viruela al infectarse intencionalmente con viruela vacuna. Este procedimiento se denominó *vacunación*, derivado de *vacca*, la palabra latina que significa vaca.

El experimento de Jenner fue exitoso porque la respuesta inmune generada contra el virus que causa la viruela vacuna es efectiva contra el virus que causa la viruela, ya que ambos están estrechamente relacionados. La mayoría de las vacunas modeRNA contiene patógenos *atenuados*, que son capaces de estimular la inmunidad pero que han sido genéticamente "paralizados" por lo que no pueden causar la enfermedad. La mayoría de las vacunas actuales en uso son para la activación de células B, como la empleada para combatir el tétanos. El tétanos es el resultado de la infección por la bacteria anaeróbica del suelo *Clostridium tetani*, que puede ingresar al cuerpo a través de una herida punzante. A medida que crece, la bacteria produce una poderosa neurotoxina que bloquea la transmisión a través de las sinapsis inhibidoras de las neuronas motoras, lo que lleva a la contracción muscular sostenida y la asfixia. A los 2 meses de edad, la mayoría de los bebés son *inmunizados* contra el tétanos mediante la inoculación con una versión modificada e inofensiva de la toxina tetánica (llamada *toxoide*). El toxoide tetánico se une a las superficies de las células B, cuyas moléculas de anticuerpos unidas a la membrana tienen un sitio de unión complementario. Estas células B proliferan para formar un clon de células que producen anticuerpos capaces de unirse a la toxina tetánica real. Esta respuesta inicial pronto mengua, pero a la persona le quedan células de memoria que responden rápidamente si la persona desarrolla una infección por *C. tetani* en una fecha posterior. A diferencia de la mayoría de las inmunizaciones, la inmunidad a la toxina tetánica no dura toda la vida, razón por la cual las personas reciben una vacuna de refuerzo cada 10 años aproximadamente. La vacuna de refuerzo contiene la proteína toxoide y estimula la producción de células de memoria adicionales. ¿Qué sucede si una persona recibe una herida que tiene el potencial de causar tétanos y no recuerda haber recibido una inyección de refuerzo? En estos casos, es probable que la persona reciba una *inmunización pasiva*, que consiste en anticuerpos que pueden unirse a la toxina del tétanos. La inmunización pasiva es efectiva solo por un corto periodo y no protege al receptor contra una infección posterior.

**REPASO**

1. ¿Por qué la inoculación con viruela vacuna ha protegido exitosamente a las personas de la infección por viruela?
2. ¿Qué se entiende por el término *inmunización pasiva*?

# 17.5 VÍAS EXPERIMENTALES



## El papel del complejo mayor de histocompatibilidad en la presentación de antígenos

En 1973, Hugh McDevitt y sus colegas de la Fundación Scripps en La Jolla, California, y en la Universidad de Stanford, demostraron que la susceptibilidad de los ratones a un patógeno particular depende del alelo presente en uno de los *loci*[1] del MHC. Encontraron que el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) causa una infección cerebral letal en ratones que son homocigotos o heterocigotos para el alelo $H—2^q$ pero que no causa infecciones en ratones que son homocigotos para el alelo $H—2^k$ en este *locus*.

Estos hallazgos llevaron a Rolf Zinkernagel y Peter Doherty, de la Universidad Nacional de Australia, a examinar el papel de los linfocitos T citotóxicos (CTL) en el desarrollo de esta enfermedad. Zinkernagel y Doherty diseñaron experimentos para correlacionar el nivel de actividad de los CTL con la gravedad de la enfermedad en ratones que tienen diferentes genotipos MHC (o haplotipos, como se les llama). La actividad de los linfocitos T citotóxicos fue monitoreada usando el siguiente protocolo experimental. Las monocapas de fibroblastos (células L) de un ratón se cultivaron y, posteriormente, se infectaron con el virus LCM. Los fibroblastos infectados fueron sobrecargados con una preparación de células del bazo de un ratón que había sido infectado con el virus LCM 7 días antes. Esperar 7 días da tiempo al sistema inmune del animal a generar CTL contra las células infectadas por virus. Los CTL se concentran en el bazo del animal infectado. Para monitorear la efectividad del ataque por los CTL en las células L cultivadas, las células L se marcaron con un radioisótopo de cromo ($^{51}Cr$), el cual se usa como marcador de la viabilidad celular: mientras una célula permanezca viva, el radioisótopo permanece dentro de ella. Si una célula debe ser lisada durante el experimento con un CTL, el $^{51}Cr$ se libera en el medio.

Zinkernagel y Doherty encontraron que el nivel de actividad CTL contra los fibroblastos cultivados, medido por la liberación de $^{51}Cr$, dependía de los genotipos relativos de los fibroblastos y las células del bazo (véase tabla 1).[2] Todos los fibroblastos utilizados para obtener la información que se muestra en la tabla 1 se tomaron de una cepa endogámica de ratones que eran homocigotos para el alelo $H—2^k$ en el *locus* H—2. Cuando las células del bazo fueron preparadas a partir de ratones que tenían un alelo $H—2^k$ (p. ej., cepas CBA/H, AKR y C3H /HeJ de ratones), las células L fueron efectivamente lisadas. Sin embargo, las células del bazo tomadas de ratones portadores de alelos $H—2^b$ o $H—2^d$ en este *locus* no pudieron lisar los fibroblastos infectados. (El $^{51}Cr$ liberado es aproximadamente el mismo cuando se usan fibroblastos no infectados en la prueba, como se muestra en la columna derecha de la tabla 1.)

Fue esencial mostrar que los resultados no eran peculiares de los ratones que portaban alelos $H—2^k$. Para hacer esta determinación, Zinkernagel y Doherty probaron células de bazo activadas por LCMV de ratones $H—2^b$ contra varios tipos de células infectadas. Una vez más, los CTL solo lisarían células infectadas que tuviesen el mismo genotipo H—2, en este caso $H—2^b$. Estos estudios proporcionaron la primera evidencia de que las moléculas del MHC en la superficie de una célula infectada restringen sus interacciones con las células T. Se dice que la función de las células T está *restringida por MHC.*

Estos y otros experimentos durante la década de 1970 establecieron preguntas acerca del papel de las proteínas MHC en la función de las células inmunes. Mientras tanto, otra línea de investigación se centraba en el mecanismo mediante el cual las células T eran estimuladas por antígenos particulares. Los estudios indicaron que las células T responden al antígeno que está unido a la superficie de otras células. Se supuso que el antígeno que se muestra simplemente se había unido a la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC) del medio extracelular. A mediados de la década de 1970 y principios de 1980, los estudios de Alan Rosenthal en los NIH, Emil Unanue en la Universidad de Harvard y otros demostraron que el APC debía internalizar el antígeno y someterlo a algún tipo de procesamiento antes de que pudiera estimular la proliferación de células T. La mayoría de estos estudios se llevó a cabo en cultivos celulares utilizando células T activadas por macrófagos que habían estado expuestos previamente a bacterias, virus u otro material extraño.

Una de las maneras de distinguir entre el antígeno que simplemente se une a la superficie de un APC y un antígeno que ha sido procesado por actividades metabólicas es comparar los eventos que pueden ocurrir a bajas temperaturas (p. ej., 4 °C) donde los procesos metabólicos se bloquean con aquellos que ocurren a temperaturas corporales normales. En uno de estos experimentos anteriores, los macrófagos se incubaron con antígeno durante una hora a 4 o 37 °C y luego se analizaron para determinar su capacidad de estimular las células T preparadas a partir de los ganglios linfáticos.[3] A concentraciones más bajas de antígeno, los macrófagos fueron casi 10 veces más efectivos para estimular las células T a 37 °C que a 4 °C, lo que sugiere que el procesamiento de antígenos requiere actividades metabólicas. El tratamiento de las células con azida de sodio, un inhibidor de la citocromo oxidasa, también inhibió la aparición del antígeno en la superficie de las células T, lo que indica que la presentación del antígeno requiere energía metabólica.[4]

Diversos experimentos llevados a cabo por Kirk Ziegler y Emil Unanue proporcionaron evidencia de que el procesamiento se producía cuando los antígenos extracelulares eran introducidos al macrófago mediante endocitosis y se liberaban en el compartimiento lisosómico de la célula.[5] Un enfoque para determinar si los lisosomas están involucrados en un proceso particular es tratar las células con sustancias como cloruro de amonio o cloroquina, que interrumpen la actividad de la enzima lisosomal. Ambos agentes aumentan el pH del compartimiento lisosomal que inactiva las hidrolasas ácidas (véase Sección 8.15). La tabla 2 muestra los efectos de estos tratamientos sobre el procesamiento y la presentación del antígeno derivado de la bacteria *Listeria*

**TABLA 1 Actividad citotóxica de las células del bazo de varias cepas de ratones inyectados 7 días antes con virus LCM para monocapas de células L de ratón infectado por LCM o normal $C_3H$ ($H—2^k$)**

| Exp | Cepa de ratón | Tipo H–2 | % $^{51}Cr$ liberado | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Infectado | Normal |
| 1 | CBA/H | *K* | 65.1± 3.3 | 17.2±0.7 |
| | Balb/C | *d* | 17.9± 0.9 | 17.2± 0.6 |
| | CB57B1 | *d* | 22.7±1.4 | 19.8±0.9 |
| | CBA/H3×C57B1 | *k/b* | 56.1±0.5 | 16.7±0.3 |
| | CB57Bl×Balb/C | *k/d* | 24.8± 2.4 | 19.8±0.9 |
| | nu/+o+ /+ | | 42.8±2.0 | 21.9±0.7 |
| | nu/un | | 23.3±0.6 | 20.0±1.4 |
| 2 | CBA/H | *k* | 85.5±3.1 | 20.9±1.2 |
| | AKR | *k* | 71.2±1.6 | 18.6±1.2 |
| | DBA/2 | *d* | 24.5± 1.2 | 21.7±1.7 |
| 3 | CBA/H | *k* | 77.9±2.7 | 25.7±1.3 |
| | C3H/HeJ | *k* | 77.8±0.8 | 24.5±1.5 |

Reimpreso con permiso de R. M. Zinkernagel y P. C. Doherty; Nature 248: 701, 1974; copyright 1974, *Nature* by Nature Publishing Group. Reproducido con el permiso de Nature Publishing Group en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center.

**TABLA 2 Inhibición de la presentación de antígeno con $NH_4Cl$ y cloroquina**

| Prueba | Control (%) | 10 mM $NH_4Cl$ Observado (%) | 10 mM $NH_4Cl$ Inhibición (%) | 0.1 mM Cloroquina Observado (%) | 0.1 mM Cloroquina Inhibición (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Captación de antígeno | 15±1 | 13±2 | 13 | 15±2 | 0 |
| Ingestión de antígeno | 66±12 | 63±2 | 5 | 67±6 | −2 |
| Catabolismo de antígeno | 29±4 | 13±3 | 55 | 14±6 | 52 |
| Unión de células T-macrófago | | | | | |
| antes de la manipulación del antígeno | 70±7 | 26±8 | 63 | 30±8 | 57 |
| después de la manipulación del antígeno | 84±8 | 70±11 | 17 | 60±10 | 24 |

*Fuente:* H. K. Ziegler y E. R. Unanue, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 79:176, 1982.

*monocytogenes*. Se puede ver en la tabla que ninguna de estas sustancias afecta la captación (endocitosis) del antígeno, pero ambas sustancias inhiben marcadamente el procesamiento del antígeno y su capacidad para estimular la unión de las células T al macrófago. Estos datos fueron los primeros en sugerir que la fragmentación de los antígenos extracelulares por las proteasas lisosómicas puede ser un paso esencial en la preparación de antígenos extracelulares antes de la presentación.

Otros estudios continuaron implicando a las moléculas del MHC en la interacción entre APC y células T. En una serie de experimentos, Ziegler y Unanue trataron macrófagos con anticuerpos dirigidos contra proteínas MHC codificadas por el *locus* H—2. Descubrieron que estos anticuerpos no tenían ningún efecto sobre la captación o el catabolismo del antígeno,[6] pero inhibían notablemente que los macrófagos interactuaran con las células T.[7] La inhibición de la unión de las células T a los macrófagos se obtuvo incluso cuando los macrófagos fueron expuestos a los anticuerpos antes de la adición del antígeno.

Las evidencias de estos y muchos otros estudios indicaron que la interacción entre una célula T y un macrófago dependía del reconocimiento de dos componentes en la superficie de la célula presentadora de antígeno: el fragmento de antígeno que se muestra y una molécula de MHC. Pero no había una imagen clara de cómo se relacionaban el fragmento de antígeno y la molécula de MHC. Se consideraron dos posibles modelos de reconocimiento de antígenos. Según un modelo, las células T poseen dos receptores distintos, uno para el antígeno y otro para la proteína MHC. De acuerdo con el otro modelo, un único receptor de células T reconoce simultáneamente tanto la proteína MHC como al antígeno peptídico en la superficie de APC. El equilibrio de la opinión comenzó a cambiar a favor del modelo de un solo receptor cuando la evidencia empezó a apuntar a una asociación física entre las proteínas MHC y los antígenos exhibidos. En un estudio, por ejemplo, se demostró que el antígeno que había sido procesado por las células T podía aislarse como un complejo con proteínas MHC.[8] En este experimento, las células T cultivadas tomadas de ratones $H—2^k$ se incubaron con antígeno marcado radiactivamente durante 40 minutos. Después del periodo de incubación, se preparó el antígeno procesado a partir de las células y se pasó a través de una columna que contenía perlas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra las proteínas MHC. Cuando las cuentas se recubrieron con anticuerpos contra la proteína $H—2^k$, una molécula de MHC presente en las células T, se adhirieron grandes cantidades de antígeno radiactivo a las cuentas, lo que indica la asociación del antígeno procesado con la proteína MHC. En cambio, si las cuentas estaban recubiertas con anticuerpos contra la proteína $H—2^b$, una proteína MHC sin presencia en las células T, quedaba relativamente poco antígeno radiactivo en la columna.

Después de estos primeros experimentos, los investigadores volvieron su atención a la estructura atómica de las moléculas involucradas en las interacciones de las células T, que se encuentran en el núcleo de la respuesta inmune. En lugar de utilizar moléculas MHC de clase II en la superficie de los macrófagos, los estudios estructurales examinaron las moléculas MHC de clase I del tipo que se encuentra en las superficies de las células infectadas por virus. El primer retrato tridimensional de una molécula de MHC se publicó en 1987 y se basó en estudios de cristalografía de rayos X de Don Wiley y sus colegas de la Universidad de Harvard.[9] Los eventos que conducen a este descubrimiento se analizan en la referencia 10. Las moléculas MHC de clase I consisten en 1) una cadena pesada que contiene tres dominios extracelulares ($\alpha_1$, $\alpha_2$ y $\alpha_3$) y un segmento de membrana única y 2) una invariante de $\beta_2$m polipéptido (véase figura 17-23). Wiley y sus colegas examinaron la estructura de la porción extracelular (soluble) de la molécula MHC ($\alpha_1$, $\alpha_2$, $\alpha_3$ y $\beta_2$m) después de eliminar el anclaje transmembrana. En la **FIGURA 1*a*)** se muestra un modelo de cinta de la estructura observada, con la parte externa (portadora de antígeno) de la proteína construida a partir de los dominios $\alpha_1$ y $\alpha_2$. Se puede ver desde la parte superior de este modelo de cinta que las superficies inteRNA de estos dominios forman las paredes de una ranura profunda de aproximadamente 25 Å de largo y 10 Å de ancho. Este surco actúa como sitio de unión de los péptidos producidos por el procesamiento del antígeno en el citoplasma. Como se muestra en la figura 1*b*, los lados del bolsillo de unión al antígeno están revestidos por hélices de los dominios $\alpha_1$ y $\alpha_2$, y el fondo del bolsillo está cubierto por una lámina β que se extiende desde estos mismos dominios a través de la línea media. Se cree que las hélices forman paredes laterales relativamente flexibles que permiten a los péptidos de secuencia diferente unirse dentro de la ranura.

Los estudios cristalográficos de rayos X posteriores describieron la manera en que los péptidos se colocan dentro del bolsillo de unión al antígeno del MHC. En uno de estos estudios, se determinó la disposición espacial de varios péptidos procesados naturalmente situados dentro del bolsillo de unión a antígeno de una molécula única de MHC de clase I (HLAB-27).[11] Las columnas vertebrales de todos los péptidos unidos a HLA-B27 comparten una única conformación que se extiende a lo largo de la hendidura de unión. Los extremos N y C de los péptidos están posicionados con precisión por numerosos enlaces de hidrógeno en ambos extremos de la hendidura. Los enlaces de hidrógeno unen el péptido a una serie de residuos conservados en la molécula de MHC que integran tanto los lados como la parte inferior de la ranura de unión.

En otro estudio clave, Ian Wilson y sus colegas del Instituto de Investigación Scripps en La Jolla, California, informaron sobre la estructura cristalográfica de rayos X de una proteína MHC clase I de ratón complejizada con dos péptidos de diferente longitud.[12,13] La estructura general de la proteína MHC de ratón es similar a la de la proteína MHC humana mostrada en la figura 1*a*. En ambos casos, los péptidos se unen en una conformación extendida en el interior de la ranura de unión de la molécula MHC (véase **FIGURA 2**). Esta conformación extendida permite numerosas interacciones entre las cadenas laterales de la molécula de MHC y la cadena principal del péptido unido. Dado que el MHC interactúa más con la cadena principal del péptido que con sus cadenas laterales, existen muy pocas restricciones sobre los residuos de aminoácidos particulares que pueden estar presentes en varios sitios del bolsillo de unión. Como resultado, cada molécula de MHC puede unirse a una diversidad de péptidos antigénicos.

(*continúa*)

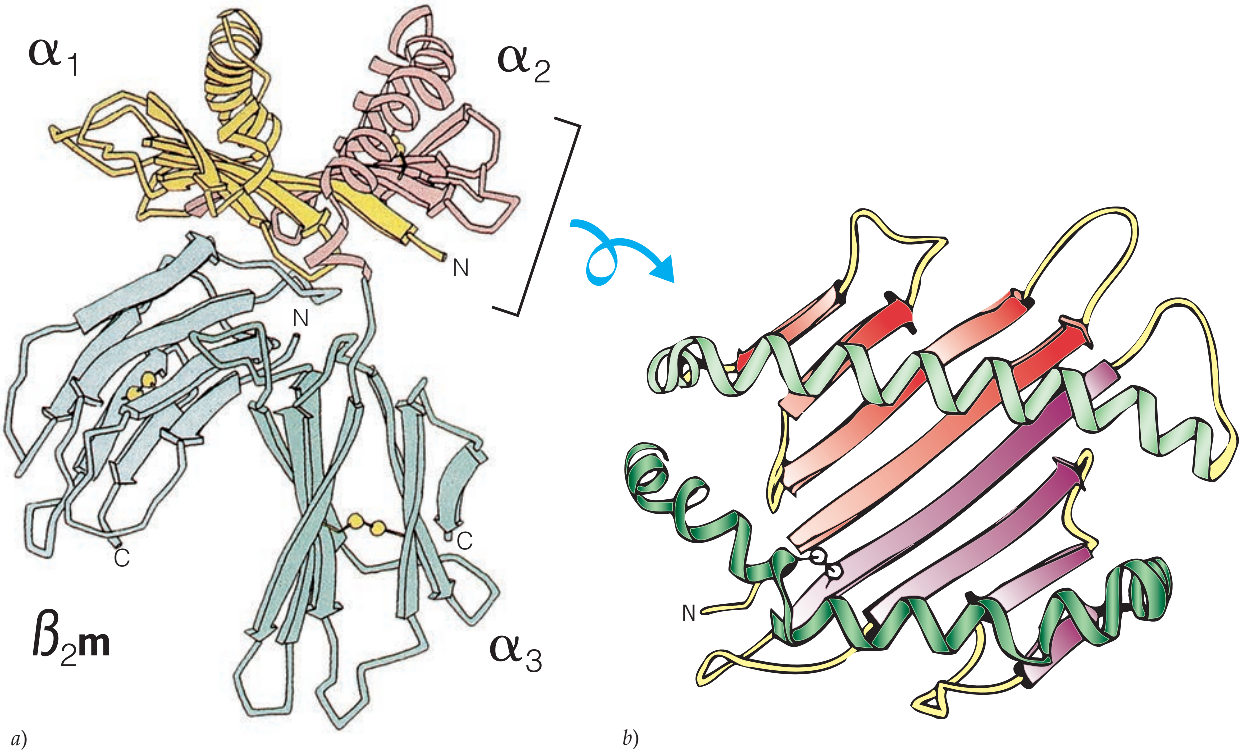



**FIGURA 1** *a*) Representación esquemática de una molécula de MHC de clase I, en este caso la proteína humana HLA-A2. La molécula consta de dos subunidades: una cadena pesada formada por tres dominios ($\alpha_1$, $\alpha_2$ y $\alpha_3$) y una cadena de $\beta_2$m. La porción de la cadena pesada que abarca la membrana se conectaría con el polipéptido en el sitio marcado C (para el extremo C). Los enlaces disulfuro se indican como dos esferas conectadas. La ranura de unión al péptido se muestra en la parte superior del dibujo, entre los segmentos helicoidales $\alpha$ de los dominios $\alpha_1$ y $\alpha_2$ de la cadena pesada. *b*) Representación esquemática del bolsillo de unión a péptido de la proteína MHC como se ve desde la parte superior de la molécula. La parte inferior del bolsillo está forrada con una capa β (flechas naranja-violeta) y las paredes con hélices (verde). El dominio $\alpha_1$ se muestra en naranja y verde claro; el dominio $\alpha_2$ se muestra en morado y verde oscuro.

FUENTE: Pamela J. Bjorkman *et al, Nature* 329: 508, 509, 1987, Fig. 2*a*, 2*b*; reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

Un complejo MHC-péptido que se proyecta desde la superficie de una célula infectada es solo la mitad de la historia del reconocimiento inmunológico; la otra mitad está representada por el receptor de células T (TCR) que se proyecta desde la superficie de la célula T citotóxica. Ha sido evidente durante más de una década que un TCR puede reconocer de algún modo tanto un MHC como su péptido contenido, pero la manera en que esto ocurre eludió a los investigadores debido a las dificultades en la preparación de cristales de proteína del TCR que eran adecuados para cristalografía de rayos X. Estas dificultades finalmente se superaron, y en 1996, los informes de ambos laboratorios Wiley y Wilson proporcionaron una imagen tridimensional de la interacción entre un MHC-péptido y TCR.[14,15] La estructura general del complejo formado entre las dos proteínas se muestra en la **FIGURA 3**, donde las columnas principales de los polipéptidos se representan como tubos.

La estructura que se muestra en la figura 3 representa las porciones de las proteínas que se proyectan entre un CTL y una célula hospedera infectada por un virus. La mitad inferior de la imagen muestra la estructura y orientación de la molécula MHC de clase I con el antígeno peptídico extendido (amarillo-verde) incrustado en el bolsillo de unión de la proteína. La mitad superior de la imagen muestra la estructura y orientación del TCR. Como se indica en la figura 17-20*b*, un TCR consta de cadenas de polipéptidos α y β, cada cadena comprende una porción variable (V) y constante (C). Al igual que las inmunoglobulinas (véase figura 17-15), la porción variable de cada subunidad de TCR contiene regiones que son excepcionalmente variables (es decir, hipervariables). Las regiones hipervariables forman bucles protuberantes (véanse en la figura 3 los segmentos coloreados de los dos polipéptidos de TCR) que se ajustan cómodamente sobre el extremo externo del complejo de MHC-péptido. Las regiones hipervariables se denominan *regiones determinantes de la complementariedad,* o CDR, porque determinan las propiedades de unión del TCR. Las CDR del TCR interactúan con las hélices α de

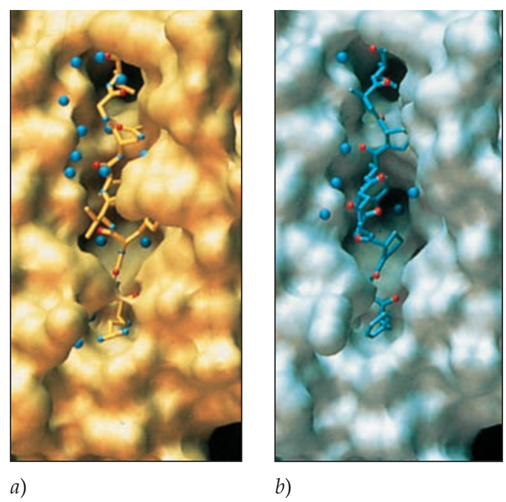



**FIGURA 2** Modelos tridimensionales de un péptido (que se muestra en la estructura de esfera y bastón) unidos dentro del bolsillo de unión a antígeno de una proteína MHC de clase I de ratón (H—2K$^b$). El péptido en *a*) consta de ocho residuos de aminoácidos; el péptido en *b*) está compuesto de nueve residuos. Se observa que los péptidos están enterrados profundamente dentro de la ranura de unión de la molécula MHC.

FUENTE: De Masazumi Matsumura, Daved H. Fremont, Per A. Peterson e Ian A. Wilson, Science 257:932, 1992. © 1992. Reproducido con permiso de AAAS.

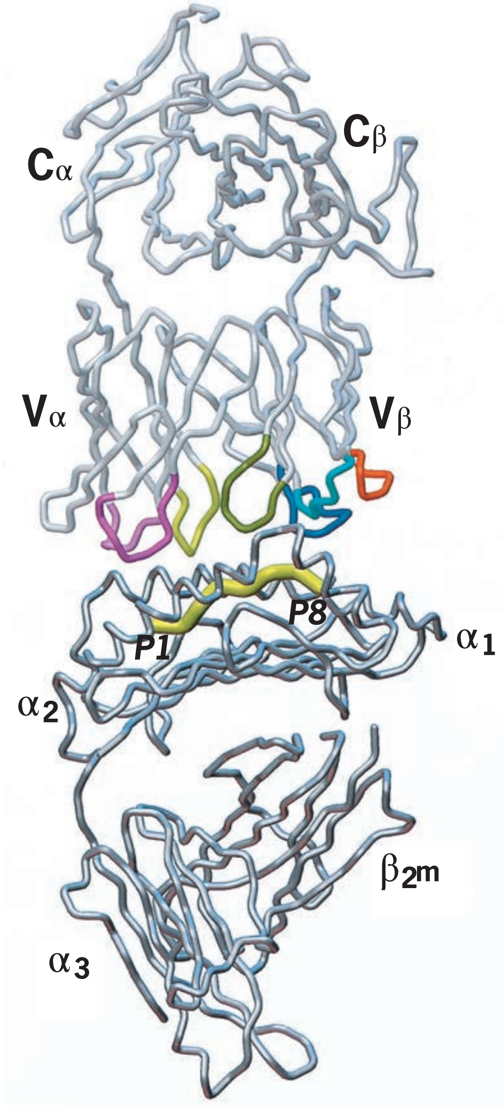



**FIGURA 3** Representación de la interacción entre un complejo MHC-péptido (en la parte inferior) y un TCR (en la parte superior). Las regiones hipervariables (CDR) del TCR se muestran como bucles de color que forman la interfase entre las dos proteínas. El péptido unido (P1-P8) se muestra en amarillo verdoso ya que está situado dentro de la ranura de unión de la molécula MHC de clase I. Las cadenas principales peptídicas se representan como tubos.

FUENTE: K. Christopher Garcia et al., Cortesía de Ian Wilson, Science 274: 217, 1996, Fig. 9d, © 1996. Reimpreso con permiso de AAAS.

los dominios $\alpha_1$ y $\alpha_2$ del MHC, así como los residuos expuestos del péptido unido. Las CDR centrales del TCR, que exhiben la mayor variabilidad de secuencia, interactúan de forma reiterada con el péptido unido situado centralmente, mientras que las CDR exteRNA, que tienen una secuencia menos variable, interactúan más estrechamente con las hélices $\alpha$ del MHC.[16] Debido a estas interacciones, el TCR cumple sus dos "responsabilidades" de reconocimiento: reconoce el péptido unido como un antígeno extraño y el MHC como una proteína propia. (La información de estudios recientes de estructuras adicionales de TCR-péptido-MHC se puede encontrar en las referencias 17-19).

## Referencias


1. Oldstone, M. B. A., *et al*. 1973. Histocompatibility-linked genetic control of disease susceptibility. *J. Exp. Medicina*. 137: 1201-1212.
2. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. 1974. Restriction of *in vitro* T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701-702.
3. Waldron, J. A., *et al*. 1974. Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes *in vitro*: Functional aspects of antigen handling by macrophages. *J. Immunol*. 112:746-755.
4. Wekerle, H., *et al*. 1972. Fractionation of antigen reactive cells on a cellular immunoadsorbant. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A*. 69:1620-1624.
5. Ziegler, K. & Unanue, E. R. 1982. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A*. 79: 175-178.
6. Ziegler, K. y Unanue, E. R. 1981. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunol*. 127:1869-1875.
7. Ziegler, K. y Unanue, E. R. 1979. The specific binding of Listeria monocytogenes-immune T lymphocytes to macrophages. I. Quantitation and role of H-2 gene products. *J. Exp. Medicina*. 150:1142-1160.
8. Puri, J. y Lonai, P. 1980. Mechanism of antigen binding by T cells H-2 (I-A)-restricted binding of antigen plus Ia by helper cells. *EUR. J*. Immunol. 10:273-281.
9. Bjorkman, P.J., *et al*. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
10. Bjorkman, P. J. 2006. Finding the groove. *Nature Immunol*. 7: 787-789.
11. Madden, D.R., *et al*. 1992. The three-dimensional structure of HLAB27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70: 1035-1048.
12. Fremont, D. H., *et al*. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K$^b$. *Science* 257: 919-927.
13. Matsumura, M., *et al*. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927-934.
14. Garcia, K. C., *et al*. 1996. An αβ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274: 209-219.
15. Garboczi, D. N., *et al*. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384: 134-140.
16. Wilson, I. A. 1999. Class-conscious TCR? *Science* 286:1867-1868.
17. Marrack, P., *et al*. 2008. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu. Rev. Immunol*. 26: 171-203.
18. Archbold, J. K., *et al*. 2008. T-cell allorecognition. *Trends Immunol*. 29:220-226.
19. Garcia, K. C., *et al*. 2009. The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nature Immunol*. 10:143-147.


## 17.6 Linfocitos T: activación y mecanismo de acción

Al igual que las otras células, las células T también están sujetas a un proceso de selección clonal. Estas poseen una proteína de superficie celular, llamada **receptor de células T**, que les permite interactuar específicamente con un antígeno particular. Al igual que las moléculas de anticuerpos que sirven como receptores de células B, las proteínas que funcionan como receptores de células T existen como una gran población de moléculas con sitios de combinación diferentes. Del mismo modo que cada célula B produce solo una especie de anticuerpo, cada célula T tiene una sola especie de receptor. Se estima que los humanos adultos po-

seen aproximadamente $10^{12}$ células T que, colectivamente, presentan más de $10^{7}$ receptores de antígenos distintos.

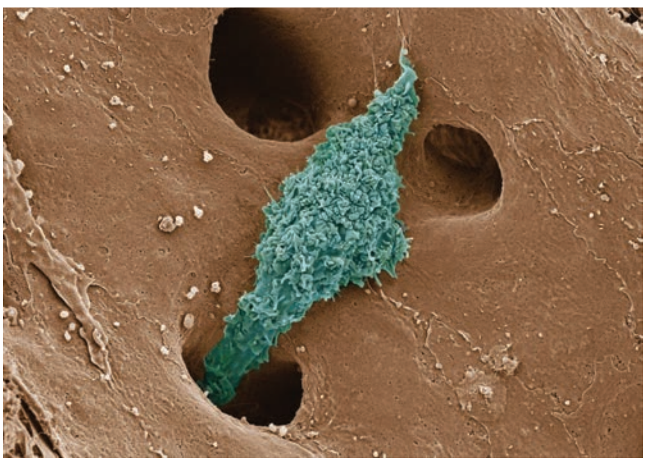
Las células T se activan mediante fragmentos de antígenos que se muestran en las superficies de otras células, llamadas **células presentadoras de antígenos** (APC). Considere lo que sucedería si una célula hepática o renal se infectara con un virus. La célula infectada mostraría partes de las proteínas virales en su superficie (véase figura 17-24), permitiendo que la célula infectada se una a una célula T con el receptor apropiado (análogo). Como resultado de esta presentación, el sistema inmune se alerta ante la entrada de un patógeno específico. El proceso de presentación del antígeno se analiza más adelante en el capítulo (véase Sección 17-11) y también es el tema de Vías experimentales.

Cualquier célula infectada puede servir como una APC para activar las células T, al igual que hay ciertos tipos de APC "profesionales" especializados para esta función. Las APC profesionales incluyen células dendríticas y macrófagos (véase **FIGURA 17-10**). Nos enfocaremos en las **células dendríticas** (DC), que fueron descubiertas y caracterizadas por Ralph Steinman de la Universidad Rockefeller a principios de la década de 1970 y que a menudo se describen como las "centinelas" del sistema inmunitario. Las células dendríticas se han ganado este título debido a que "vigilan" los tejidos periféricos del cuerpo donde es probable que entren los patógenos (como la piel y las vías respiratorias). Las DC están equipadas con una amplia variedad de receptores capaces de reconocer virtualmente todo tipo de patógeno. Esta propiedad hace que las DC sean un componente principal del sistema inmune innato (véase página 663). Como se analiza en los siguientes párrafos, las DC utilizan la información sobre los patógenos que ingieren para iniciar una respuesta de las células apropiadas del sistema inmune adaptativo.

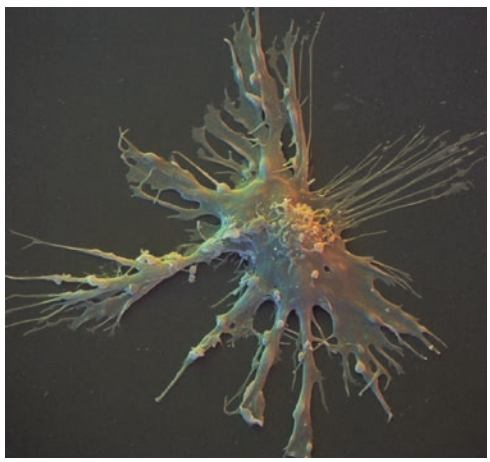
Cuando están presentes en los tejidos periféricos del cuerpo, las DC inmaduras reconocen e ingieren microbios y otros materiales extraños por fagocitosis. Una vez que un microbio es internalizado por una célula dendrítica, debe ser procesado antes de que sus componentes puedan ser presentados a otra célula. El procesamiento del antígeno requiere que el material ingerido se fragmente enzimáticamente en el citoplasma y los fragmentos movidos a la superficie de la célula (véase figura 17-23). Las DC que tienen antígeno procesado migran a los ganglios linfáticos cercanos donde se diferencian en células maduras presentadoras de antígeno. Una vez en un ganglio linfático, las DC entran en contacto con una gran cantidad de células T, incluido un porcentaje diminuto cuyos receptores de células T pueden unirse específicamente con el antígeno extraño procesado, que activa la célula T. Este proceso dinámico de las interacciones de las DC-T se ha visualizado recientemente en los tejidos de los ganglios linfáticos vivos mediante imágenes microscópicas de las células marcadas fluorescentemente (véase **FIGURA 17-11**). En ausencia de antígeno, una DC determinada puede interactuar transitoriamente con hasta 500 a 5 000 células T diferentes, permaneciendo en contacto con cada célula durante solo unos minutos (como en la figura 17-11). Por el contrario, cuando la DC muestra un antígeno que es específicamente reconocido por el TCR de la célula T, la interacción entre las células dura un periodo de horas, lo que lleva a la activación de la célula T, como lo demuestra un incremento transitorio de la concentración de $Ca^{2+}$ citosólico.

Una vez activada, una célula T prolifera para formar clonas de células T que tienen el mismo receptor de células T. Se estima que una sola célula T activada puede dividirse de tres a cuatro veces por día durante varios días, generando una tremenda población de células T capaces de interactuar con el antígeno extraño. La proliferación masiva de linfocitos T específicos en respuesta a una infección a menudo se refleja en la ampliación de los ganglios linfáticos locales. Una vez que se ha eliminado el antígeno extraño, la gran mayoría de la población de células T expandida muere por apoptosis, dejando atrás una población relativamente pequeña de células T de memoria capaces de responder de forma rápida en caso de contacto futuro con el mismo patógeno.

A diferencia de las células B, que secretan anticuerpos, las células T realizan su función asignada a través de interacciones directas con otras células, incluidas las células B, otras células T o células diana localizadas en todo el cuerpo. Esta interacción célula-célula puede conducir a la activación, inactivación o muerte de una de estas. Además del contacto celular directo, muchas interacciones de células T están mediadas por mensajeros químicos altamente activos, llamados **citocinas**, que funcionan en concentraciones muy bajas. Las citocinas son pequeñas proteínas secretadas por una amplia variedad de células e incluyen interferones (IFN), interleucinas (IL) y factores de necrosis tumoral (TNF). Las citocinas se unen a receptores específicos en la superficie de una célula que responde generando una señal interna que altera su actividad. Al responder a una citocina, una célula puede prepararse para dividirse, experimentar diferenciación o secretar sus propias citocinas. Una familia de citocinas pequeñas, llamadas *quimiocinas*, actúa de manera principal como quimioatrayentes



*a*)



*b*)

**FIGURA 17-10 Células presentadoras de antígeno (APC) profesionales.** *a*) Micrografía electrónica de barrido coloreada de una célula de Kupffer (un tipo de macrófago) a medida que penetra en las aberturas del endotelio que recubre los vasos sinusoidales del hígado. Estas células son capaces de ingerir glóbulos rojos envejecidos y patógenos y acumularse en sitios de infección o lesión. *b*) SEM coloreado de una célula dendrítica. Estas células de forma irregular, que se caracterizan por largas proyecciones citoplasmáticas (o dendríticos), se concentran en los tejidos que recubren las superficies del cuerpo con el entorno externo.

FUENTE: *a*) Cortesía de Thomas Deerinck, NCMIR, Universidad de California, San Diego; *b*) David Scharf/Photo Researchers, Inc.

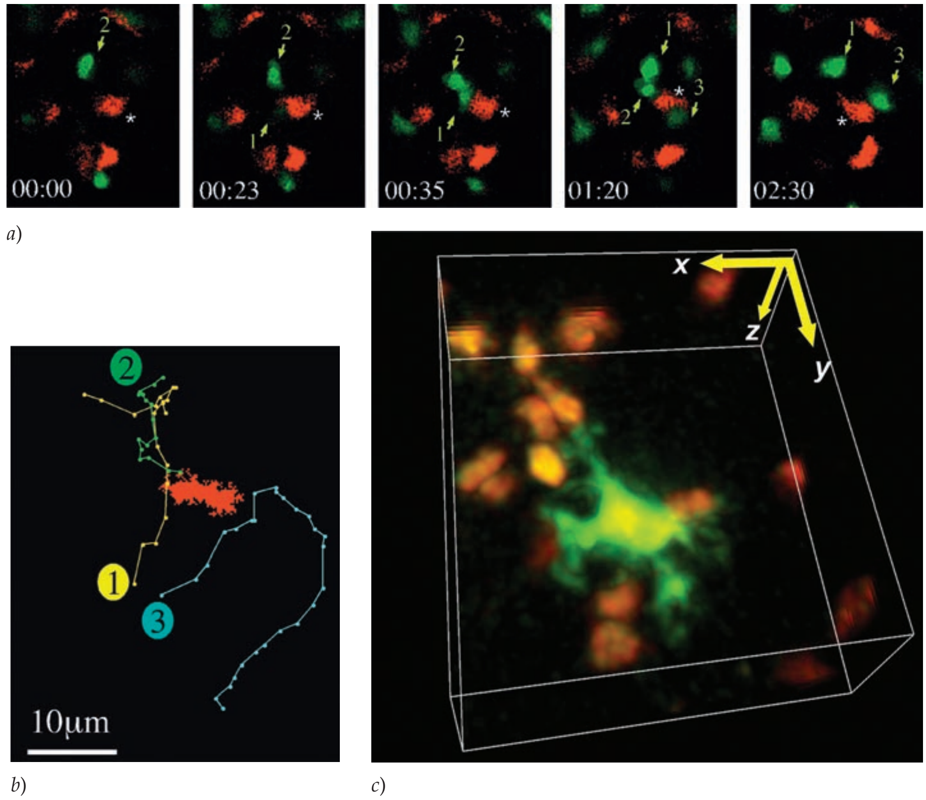



**FIGURA 17-11 Imágenes en vivo de DC y células T, y sus interacciones, dentro de un ganglio linfático.** Las células T viajan de ganglio linfático en ganglio linfático dentro del cuerpo. Cuando ingresan a un nodo linfático, migran dentro del tejido a medida que su superficie es barrida por DC individuales con las que entran en contacto. *a*) Varias células T marcadas fluorescentemente (teñidas de verde, tres de las cuales están indicadas por números etiquetados) se ven moviéndose dentro de un ganglio linfático y entrando en contacto con una DC individual (teñida de rojo e indicada por el asterisco) durante un periodo de 2.5 minutos. *b*) La trayectoria tomada por cada una de las tres células T numeradas y la DC marcada con asterisco mostrada en la parte *a*. *c*) Contactos dentro de un ganglio linfático entre una sola DC (verde) y varias células T (naranja) representadas en tres dimensiones. Los contactos entre las células son dinámicos y cambian rápidamente de tamaño durante un periodo de decenas de segundos.

FUENTE: *a*, *b*) De Philippe Bousso y Ellen Robey, *Nature Immunol*. 4:581, 2003. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.; *c*) De Mark J. Miller *et al*., Cortesía de Michael D. Cahalan, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 101:1002, 2004 © 2004, National Academy of Sciences, U.S.A.

que estimulan la migración de los linfocitos al tejido inflamado. Diferentes tipos de linfocitos y fagocitos poseen receptores para distintas quimiocinas, por lo que sus patrones de migración pueden controlarse por separado. Una lista de algunas de las citocinas mejor estudiadas se incluye en la tabla 17-1.

Tres subclases principales de células T se pueden distinguir por las proteínas en sus superficies y sus funciones biológicas.

1. Los **linfocitos T citotóxicos (CTL)** examinan las células del cuerpo en busca de anomalías. En circunstancias normales, los CTL no dañan las células sanas, pero las células envejecidas o infectadas, y posiblemente algunas células malignas, son atacadas y asesinadas. Los CTL matan las células diana induciéndolas a sufrir apoptosis. Se han descrito dos vías distintas de destrucción de células. En una vía, el CTL libera perforinas y granzimas en un espacio cerrado entre las células. Las *perforinas* son proteínas que se ensamblan dentro de la membrana de la célula diana para formar canales transmembrana. Las *granzimas* son enzimas proteolíticas que entran en los canales de perforina y activan las caspasas, que son las enzimas proteolíticas que inician la respuesta apoptótica (véase Sección 15.17). En la vía alternativa, el CTL se une a un receptor en la superficie celular blanco, activando una vía suicida en la célula blanco similar a la observada en la figura 15-39. Al matar las células infectadas, los CTL eliminan los virus, las bacterias, las levaduras, los protozoos y los parásitos después de que han llegado a las células del huésped y ya no son accesibles a los anticuerpos circulantes. Los CTL poseen una proteína de superficie llamada CD8 (denominación de grupo 8) y son referidas a las células $CD8^+$.
2. **Los *linfocitos T cooperadores (células $T_H$)*** activan otras células inmunes en un ataque orquestado contra un patógeno específico. Se distinguen de los CTL por la presencia de la proteína CD4 en su superficie en lugar de CD8.[1] Las células $T_H$ son activadas por células presentadoras de antígenos profesionales, tales como células dendríticas y macrófagos, como se muestra en la figura 17-12. Este es uno de los primeros y más importantes pasos para iniciar una respuesta inmune adaptativa. Casi todas las células B requieren la ayuda de células $T_H$ antes de que puedan madurar y diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las células B se activan por interacción directa con una célula $T_H$ que es específica para el mismo antígeno, como se muestra en la **FIGURA 17-12** (y con

**TABLA 17-1 Citocinas seleccionadas**

| Citocina | Fuente | Funciones principales |
|---|---|---|
| IL-1 | Diverso | Induce la inflamación, estimula la proliferación de las células $T_H$ |
| IL-2 | Células $T_H$ | Estimula la proliferación de las células T y las células B |
| IL-4 | Células T | Induce el cambio de clase IgM a IgG en las células B, suprime la acción inflamatoria de las citocinas |
| IL-5 | Células $T_H$ | Estimula la diferenciación de las células B |
| IL-10 | Células T, macrófagos | Inhibe la función de los macrófagos, suprime la acción de las citocinas inflamatorias |
| IFN-γ | Células $T_H$, CTL | Induce la expresión de MHC en APC, activa las células NK |
| TNF-α | Diversa | Induce inflamación, activa la producción de NO en macrófagos |
| GM-CSF | Células $T_H$, CTL | Estimula el crecimiento y la proliferación de granulocitos y macrófagos |

[1] Existen tres subpoblaciones principales de células T cooperadoras, células $T_H1$, $T_H2$ y $T_H17$, que pueden distinguirse por las citocinas que secretan. Todas estas células T cooperadoras estimulan las células B para producir anticuerpos, pero cada una tiene una función única. Las células $T_H1$ producen IFN-γ, que protege al cuerpo activando los macrófagos para matar los patógenos intracelulares que puedan albergar (véase Sección 9.15). Las células $T_H2$ producen IL-4, que moviliza mastocitos, basófilos y eosinófilos para proteger contra los patógenos extracelulares, especialmente los gusanos parásitos. Las células $T_H17$ producen IL-17, que se cree estimula las células epiteliales para reclutar fagocitos y así prevenir la entrada de bacterias y hongos extracelulares en el cuerpo. Las células $T_H17$ también están implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Los tres subtipos de células $T_H$ se diferencian de un precursor común después de la estimulación por diferentes citocinas y se definen por la presencia de diferentes factores de transcripción "maestros" (véase Sección 12.11).

más detalle en la figura 17-26). Por tanto, la formación de anticuerpos requiere la activación tanto de células T como de células B capaces de interactuar específicamente con el mismo antígeno. La importancia de las células $T_H$ se hace evidente cuando se consideran los efectos devastadores provocados por el VIH, el virus que causa el sida. Las células $T_H$ son los principales blancos de este virus. La mayoría de las personas infectadas por el mismo permanecen libres de síntomas, siempre y cuando su recuento de células $T_H$ permanezca relativamente alto, por encima de 500 células/µL de sangre (el recuento normal es superior a 1 000 células/µL). Una vez que el recuento desciende a menos de 200 células/µL, una persona desarrolla sida en toda regla y se vuelve propensa al ataque de patógenos virales y celulares.

3. ***Los linfocitos T reguladores* (*células $T_{Reg}$*)** son principalmente células inhibidoras que suprimen la proliferación y las actividades de varios tipos de células inmunes. Casi todas las actividades supresoras de las células $T_{Reg}$ se han estudiado *in vitro*, por lo cual no queda claro cómo funcionan en el cuerpo. Las células $T_{Reg}$ se caracterizan por la posesión de marcadores de superficie $CD4^+$ $CD25^+$ y se cree que desempeñan un papel importante en la limitación de la inflamación y el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica. Las células $T_{Reg}$ realizan esta última actividad mediante la supresión de los CTL que llevan a los receptores autorreactivos a atacar las propias células del cuerpo. Las $T_{Reg}$ también parecen proteger a un feto del ataque inmunológico de la madre embarazada. Por otro lado, estas mismas células pueden ser perjudiciales para nuestra salud al evitar que el sistema inmune libere al cuerpo de las células tumorales. La diferenciación de las células $T_{Reg}$ requiere estimulación por la citocina IL-2 y conduce a la expresión por las células de un factor clave de transcripción, FOXP3. Las mutaciones en el gen *FOXP3* provocan una enfermedad mortal (IPEX), que se caracteriza por una autoinmunidad grave en niños recién nacidos. Se sospecha ampliamente que los defectos en las células $T_{Reg}$ desempeñan un papel clave en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades autoinmunes. Los estudios de este tipo de célula han proporcionado una demostración directa de que la homeostasis en el sistema inmune requiere un estrecho equilibrio entre las influencias estimuladoras e inhibitorias.

**REPASO**

1. ¿Cómo revela una célula infectada en el cuerpo su condición a una célula T? ¿Cuál es la respuesta de la célula T?
2. ¿Qué es un APC? ¿Qué tipos de células pueden actuar como APC?
3. Compare y contraste las propiedades y funciones de una célula $T_H$ y una CTL. Una célula $T_H$ y una célula $T_{Reg}$.

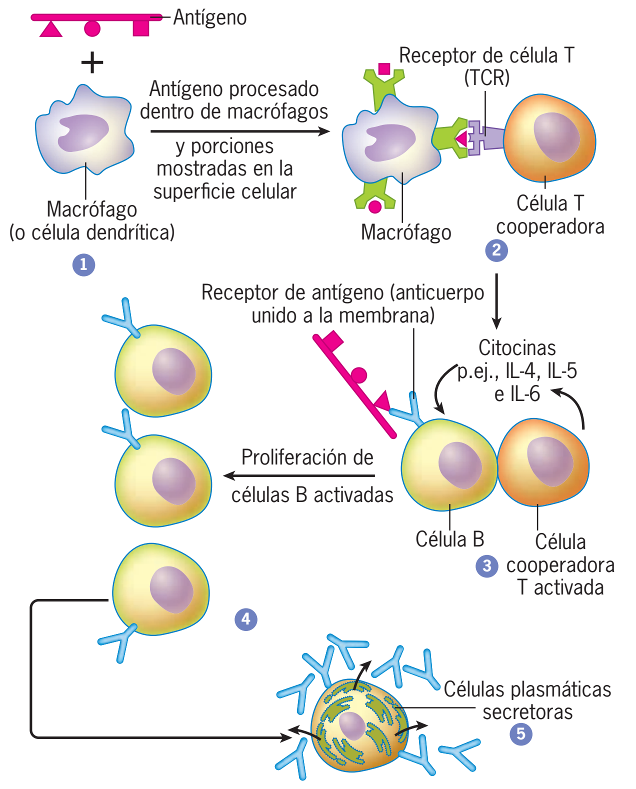



**FIGURA 17-12 Dibujo esquemático altamente simplificado que muestra el papel de las células $T_H$ en la formación de anticuerpos.** En la etapa 1, el macrófago interactúa con el antígeno complejo. El antígeno se introduce en el macrófago y se divide en fragmentos, que se muestran en la superficie de la célula. En la etapa 2, el macrófago interactúa con una célula $T_H$ cuyo TCR está unido a uno de los fragmentos de antígeno mostrados (la proteína de membrana verde es una molécula de MHC, Sección 17.5). Esta interacción activa la célula T. En la etapa 3, la célula $T_H$ activada interactúa con una célula B cuyo receptor de antígeno está unido a un antígeno soluble intacto. La activación de las células B es estimulada por las citocinas (p. ej., IL-4, IL-5 e IL-6) liberadas por la célula $T_H$ en el espacio que la separa de la célula B adyacente. La interacción con la célula $T_H$ activa la célula B, haciendo que prolifere (etapa 4). La progenie de la célula B activada se diferencia en células plasmáticas que sintetizan anticuerpos que pueden unirse al antígeno (etapa 5).

## 17.7 La estructura modular de los anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas producidas por las células B y sus descendientes (células plasmáticas). Las células B incorporan moléculas de anticuerpos en su membrana plasmática, donde sirven como receptores de antígenos, mientras que las células plasmáticas secretan estas proteínas en la sangre u otros fluidos corporales, donde sirven como un arsenal molecular en la guerra del cuerpo en contra los patógenos invasores. La interacción entre los anticuerpos formados en la sangre y las moléculas en la superficie de un virus o célula bacteriana puede neutralizar la capacidad del patógeno de infectar una célula hospedera y facilitar la ingestión y destrucción del patógeno por parte de los fagocitos errantes. El sistema inmune produce millones de moléculas de anticuerpos diferentes que, en conjunto, pueden unirse a cualquier tipo de sustancia extraña a la que el cuerpo pueda estar expuesto. Aunque el sistema inmunitario muestra una gran diversidad a través de los anticuerpos que produce, una sola molécula de anticuerpo puede interactuar con una o pocas estructuras antigénicas estrechamente relacionadas.

Los anticuerpos son proteínas globulares llamadas *inmunoglobulinas*. Las inmunoglobulinas están compuestas de dos tipos de cadenas de polipéptidos, **cadenas pesadas** más grandes (masa molecular de 50 000 a 70 000 daltones) y **cadenas ligeras** más pequeñas (masa molecular de 23 000 daltones). Los dos tipos de cadenas están vinculados entre sí en pares por enlaces disulfuro. Cinco clases diferentes de inmunoglobulinas (*IgA*, *IgD, IgE, IgG* e *IgM*) han sido identificadas. Las diferentes inmunoglobulinas aparecen en distintos momentos después de la exposición a una sustancia extraña y tienen diferentes funciones biológicas (véase tabla 17-2). Las moléculas de IgM son los primeros anticuerpos secretados por las células B después de la estimulación por un antígeno, que aparecen en la sangre después de un retraso de unos pocos días (véase **FIGURA 17-13**). Las moléculas de IgM tienen una vida media relativamente corta (un promedio de 5 días) y su aparición es seguida por la secreción de IgG de vida media larga y/o moléculas de IgE. Las moléculas de IgG son los anticuerpos predominantes en la sangre y la linfa durante una respuesta secundaria a la mayoría de los antígenos (véase figura 17-13). Las moléculas de IgE se producen a altos niveles en respuesta a mu-

**TABLA 17-2 Clases de inmunoglobulina humana**

| Clases | Cadena pesada | Cadena ligera | Masa molecular (kDa) | Propiedades |
|---|---|---|---|---|
| IgA | α | κ o λ | 360-720 | Presente en lágrimas, moco nasal, leche materna, secreciones intestinales |
| IgD | δ | κ o λ | 160 | Presente en las membranas plasmáticas de células B; función incierta |
| IgE | ∊ | κ o λ | 190 | Se une a los mastocitos, liberando histamina responsable de las reacciones alérgicas |
| IgG | γ | κ o λ | 150 | Anticuerpos solubles nacidos en sangre primaria, cruza la placenta |
| IgM | μ | κ o λ | 950 | Presente en membranas plasmáticas de células B; media la respuesta inmune inicial; activa complemento de exterminio de bacterias |

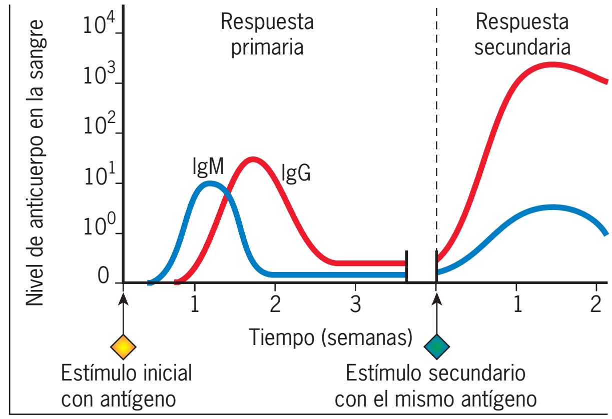



**FIGURA 17-13 Respuestas primarias y secundarias de anticuerpos.** Una respuesta primaria, que es provocada por una exposición inicial a un antígeno, esto conlleva primero a la producción de moléculas de anticuerpos IgM solubles, seguido de la producción de moléculas de anticuerpos IgG solubles. Cuando el antígeno se reintroduce en un momento posterior, se inicia una respuesta secundaria. En contraste con la respuesta primaria, la respuesta secundaria comienza con la producción de moléculas IgG (así como IgM), lo que conduce a un nivel de anticuerpos mucho más alto en la sangre y se produce casi sin demora.

chas infecciones parasitarias. Las moléculas de IgE también se unen con alta afinidad a la superficie de los mastocitos, lo que desencadena la liberación de histamina, que causa inflamación y síntomas de alergia. La IgA es el anticuerpo predominante en las secreciones de los tractos respiratorio, digestivo y urogenital y actúa para proteger estos revestimientos de la mucosa de los patógenos. La función de IgD no ha sido esclarecida.

Hay dos tipos de cadenas ligeras, cadenas kappa (κ) y cadenas lambda (λ), ambas presentes en las cinco clases de inmunoglobulinas. En contraste, cada clase de inmunoglobulina tiene una cadena pesada única que define esa clase (véase tabla 17-2).[2] Nos enfocaremos principalmente en la estructura de las IgG. Una molécula de IgG está compuesta de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas dispuestas para formar una molécula en forma de Y, como se muestra en la **FIGURA 17-14*a*)** y se describe a continuación.

Para determinar la base de la especificidad del anticuerpo, primero fue necesario determinar la secuencia de aminoácidos de varios anticuerpos específicos. Normalmente, el primer paso en la secuenciación de aminoácidos es purificar la proteína particular que se va a estudiar. Sin embargo, en condiciones normales, es imposible obtener una preparación purificada de un anticuerpo específico de la sangre porque cada persona produce una gran cantidad de moléculas de anticuerpos diferentes que son de estructura demasiado similar para separarse una de la otra. El problema se resolvió cuando se descubrió que la sangre de pacientes que padecían un tipo de cáncer linfoide llamado mieloma múltiple contenía grandes cantidades de molécula de anticuerpo única.

Como se describe en el capítulo 16, el cáncer es una enfermedad monoclonal; es decir, las células de un tumor surgen de la proliferación de una sola célula errática. Debido a que un solo linfocito *normalmente* produce una sola especie de anticuerpo, un paciente con mieloma múltiple produce grandes cantidades del anticuerpo específico que es sintetizado por la célula particular que se volvió maligna. Un paciente produce una especie de anticuerpo muy abundante y otros pacientes producen diferentes anticuerpos. Como resultado, los investigadores pudieron purificar cantidades sustanciales de varios anticuerpos de varios pacientes y comparar sus secuencias de aminoácidos. Pronto se reveló un patrón importante. Se encontró que la mitad de cada cadena ligera kappa tiene una secuencia constante de aminoácidos entre todas las cadenas kappa, mientras que la otra mitad varía de paciente a paciente. Una comparación similar de las secuencias de aminoácidos de varias cadenas lambda de diferentes pacientes reveló que también consisten en una sección de secuencia constante y una sección cuya secuencia varía de una inmunoglobulina a la siguiente. Las cadenas pesadas de IgG purificadas también contienen una porción variable (V) y una constante (C). En la figura 17-14*b*) se muestra una estructura esquemática de una de estas moléculas de IgG.

Se descubrió además que, mientras que aproximadamente la mitad de cada cadena ligera consta de una región variable ($V_L$), solo un cuarto de cada cadena pesada es variable ($V_H$) entre diferentes pacientes; los tres cuartos restantes de la cadena pesada ($C_H$) son constantes para todas las IgG. La porción constante de la cadena pesada se puede dividir en tres secciones de aproximadamente la misma longitud que son claramente homólogas entre sí. Estas unidades homólogas de Ig se designan $C_{H1}$, $C_{H2}$ y $C_{H3}$ en la figura 17-14*b*). Parece que las tres secciones de la parte C de la cadena pesada de IgG (así como las de las cadenas pesadas de las otras clases de Ig y las porciones C de las cadenas ligeras kappa y lambda) surgieron durante la evolución por la duplicación de un gen ancestral que codifica para una unidad de Ig de aproximadamente 110 aminoácidos. También se cree que las regiones variables ($V_H$ o $V_L$) han surgido de la evolución de la misma unidad de Ig ancestral. El análisis estructural indica que cada una de las unidades de Ig homólogas de una cadena ligera o pesada se pliega independientemente para formar un dominio compacto que se mantiene unido mediante un enlace disulfuro (véase figura 17-15). En una molécula de IgG intacta, cada dominio de cadena ligera se asocia con un dominio de cadena pesada como se muestra en la figura 17-14*a, b*). El análisis genético indica que cada dominio está codificado por su propio exón.

La especificidad de un anticuerpo está determinada por los aminoácidos de los sitios de combinación de antígeno en los extremos de cada brazo de la molécula de anticuerpo en forma de Y (véase figura 17-14). Los dos sitios de combinación de una sola molécula de IgG son idénticos, y cada uno se forma por la asociación de la porción variable de una cadena ligera con la parte variable de una cadena pesada (véase figura 17-14). El ensamblaje

[2] Los humanos actualmente producen cuatro cadenas pesadas relacionadas como parte de sus moléculas IgG (formando IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y dos cadenas pesadas relacionadas como parte de sus moléculas IgA (formando IgA1 e IgA2)(véase figura 17.19). Estas diferencias no serán mencionadas en el siguiente análisis.

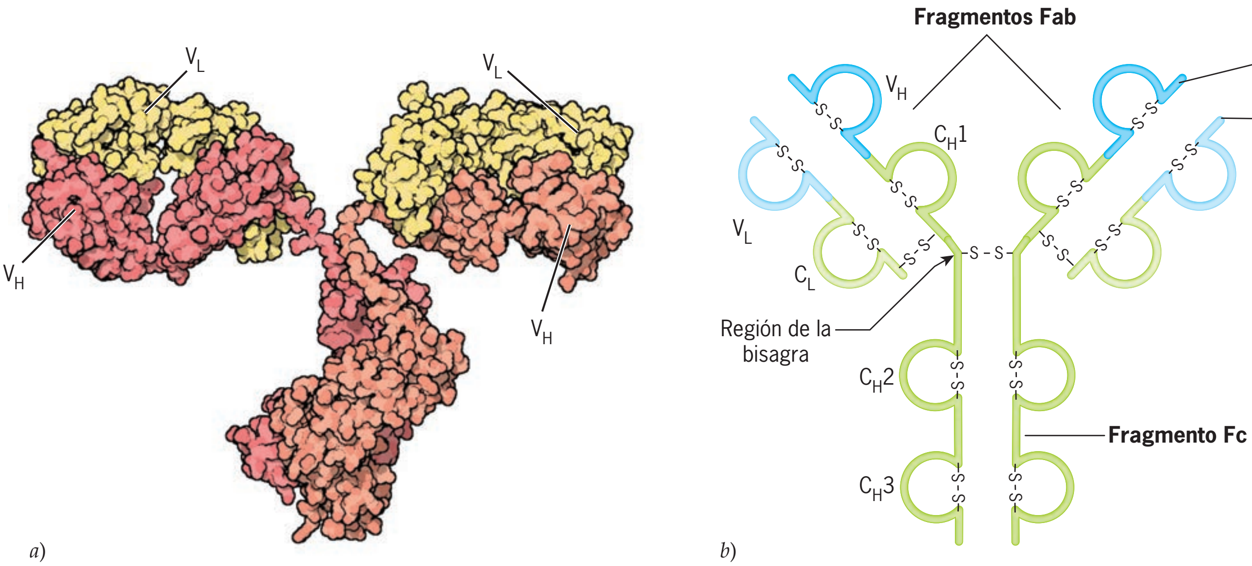



**FIGURA 17-14 Estructura del anticuerpo.** *a*) Modelo de relleno espacial de una molécula de IgG. La molécula contiene cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Una de las cadenas pesadas se muestra en naranja, la otra en rosa, mientras que ambas cadenas ligeras se muestran en amarillo. Los dominios de cada cadena (dos para la cadena ligera y cuatro para la cadena pesada) son evidentes. *b*) Modelo esquemático que muestra la estructura de dominio de una molécula de IgG. La estructura terciaria de cada dominio Ig se mantiene mediante un enlace disulfuro. Los dominios que comprenden una región constante de la cadena polipeptídica se indican mediante la letra C; los dominios que comprenden una región variable se indican mediante la letra V. Cada cadena pesada contiene tres regiones $C_H$ ($C_H1$, $C_H2$, $C_H3$) y una región $V_H$ en el extremo N-terminal del polipéptido. Cada cadena ligera contiene una región $C_L$ y una región $V_L$ en su extremo N-terminal. Las regiones variables de cada cadena ligera y pesada forman un sitio de combinación de antígeno. Cada molécula de IgG en forma de Y contiene dos sitios idénticos de combinación de antígenos. Cada molécula de IgG puede fragmentarse mediante un tratamiento proteolítico suave en dos fragmentos Fab que contienen los sitios de unión al antígeno y un fragmento de Fc, como se indica.

FUENTE: *a*) Cortesía de David Goodsell/RSCB PDB, 2001.

de anticuerpos de diferentes combinaciones de cadenas ligeras y pesadas permite a una persona producir una tremenda variedad de anticuerpos a partir de un número modesto de diferentes polipéptidos (véase Sección 17.8).

Una mirada más cercana a los polipéptidos de las inmunoglobulinas revela que las porciones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen subregiones que son especialmente variables, o *hipervariables*, de un anticuerpo a otro (marcado Hv en la **FIGURA 17-15**). Las cadenas ligera y pesada contienen tres tramos hipervariables que se agrupan en los extremos de cada brazo en la molécula de anticuerpo. Como podría esperarse, las regiones hipervariables desempeñan un papel destacado en la formación de la estructura del sitio de combinación del antígeno, que puede cambiar desde una hendidura profunda hasta una ranura estrecha o una bolsa relativamente plana. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de las regiones hipervariables explican la gran diversidad de especificidad del anticuerpo, permitiendo que estas moléculas se unan a antígenos de todas las formas imaginables.

El sitio de combinación de un anticuerpo tiene una estructura estereoquímica complementaria a una porción particular del antígeno, que se denomina **epítopo (o determinante antigénico)**. Debido a su estrecho ajuste, los anticuerpos y antígenos forman complejos estables, a pesar de que están unidos solo por fuerzas no covalentes que individualmente son bastante débiles. La interacción precisa entre un antígeno particular y un anticuerpo, según se determina por cristalografía de rayos X, se muestra en la **FIGURA 17-16**. Las dos regiones de las bisagras dentro de la molécula (véase figura 17-14) proporcionan la flexibilidad necesaria para que el anticuerpo se una a dos moléculas de antígeno separadas o a una sola molécula con dos epítopos idénticos.

Mientras que las porciones hipervariables de cadenas ligeras y pesadas determinan la especificidad del sitio de combinación de un anticuerpo, las porciones restantes de los dominios variables proporcionan un soporte que mantiene la estructura general del sitio de combinación. Las porciones constantes de las moléculas de anticuerpos también son importantes. Las diferentes clases de anticuerpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) tienen distintas cadenas pesadas, cuyas regiones constantes difieren considerablemente en longitud y secuencia. Estas diferencias permiten a los anticuerpos de diversas clases llevar a cabo diferentes funciones biológicas (efectoras). Por ejemplo, las cadenas pesadas de una molécula de IgM se unen y activan una de las proteínas del sistema del complemento, lo que conduce a la lisis de las células bacterianas a las que están unidas las moléculas de IgM. Las cadenas pesadas de moléculas de IgE desempeñan un papel importante en las reacciones alérgicas uniéndose a receptores específicos en la superficie de los mastocitos, lo que desencadena la liberación de histamina. Por el contrario, las cadenas pesadas de una molécula de IgG se unen

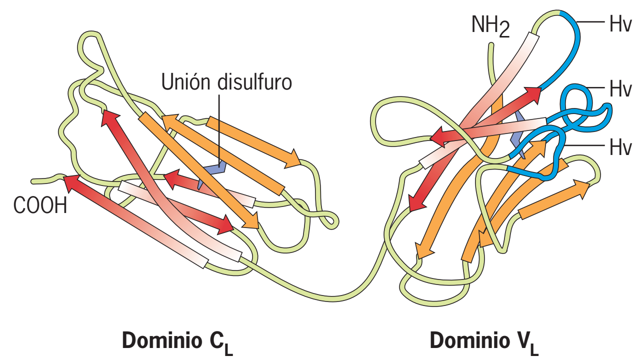



**FIGURA 17-15 Dominios de anticuerpo.** Ilustración esquemática de una cadena ligera lambda sintetizada por células de un paciente con mieloma múltiple. El polipéptido se somete a plegamiento de modo que las porciones constantes y variables están presentes en dominios separados. Las flechas gruesas representan hebras β, que se ensamblan en láminas β. Cada dominio tiene dos láminas β, que se distinguen por los colores rojo y naranja. Los tres segmentos hipervariables (Hv) de la cadena están presentes como bucles en un extremo del dominio variable, que forma parte del sitio de combinación del antígeno en el anticuerpo.

FUENTE: Reimpreso (adaptado) con permiso de Schiffer *et al*; Biochemistry 12:4628, 1973. Copyright 1973. American Chemical Society.

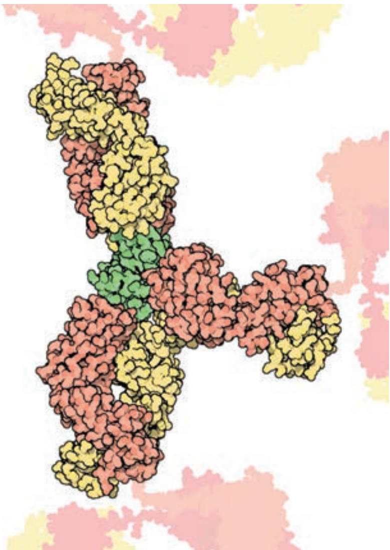


**FIGURA 17-16 Interacción antígeno-anticuerpo.** Modelo de llenado de espacio basado en cristalografía de rayos X de un complejo entre porciones de lisozima (verde) y porciones Fab de tres moléculas de anticuerpo diferentes (véase la figura 17-14). La cadena pesada del anticuerpo es naranja; la cadena ligera es amarilla. Tenga en cuenta que cada fragmento Fab reconoce una porción diferente de la proteína lisozima.

FUENTE: Cortesía de David Goodsell/RCSB/PDB, 2001.

específicamente a los receptores de superficie de macrófagos y neutrófilos, induciendo a estas células fagocíticas a ingerir la partícula a la que están unidos los anticuerpos. Las cadenas pesadas de moléculas de IgG también son importantes para permitir que esta clase de anticuerpos pase de los vasos sanguíneos de una madre a los de su feto durante el embarazo. Si bien esto proporciona al feto y al neonato inmunidad pasiva frente a organismos infecciosos, puede causar una afección potencialmente mortal llamada eritroblastosis fetal. Para que esta condición ocurra, una madre $Rh^-$ (que carece de la proteína Rh en sus glóbulos rojos) debe haber dado a luz un niño con un fenotipo $Rh^+$ (genotipo $Rh^+/Rh^-$) durante un embarazo anterior. La madre generalmente está expuestas al antígeno fetal $Rh^+$ durante el parto del primer hijo, que *no* está afectado. Sin embargo, si la madre tiene un segundo embarazo $Rh^+$, los anticuerpos presentes en su torrente sanguíneo pueden ingresar a la circulación fetal y destruir los glóbulos rojos del feto. Los bebés con esta condición reciben una transfusión de sangre, ya sea antes (intrauterina) o después del nacimiento, que limpia la sangre de los anticuerpos maternos.

**REPASO**

1. Dibuje la estructura básica de una molécula de IgG unida a un epítopo de un antígeno. Señale las cadenas pesada y ligera; las regiones variables y constantes de cada cadena, y las regiones que contendrían secuencias hipervariables.

## 17.8 Reordenamientos de DNA que producen genes que codifican receptores de los antígenos de células B y T

Como se analizó anteriormente, cada molécula de IgG está compuesta de dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). Ambos tipos de polipéptidos consisten en dos partes reconocibles: una porción variable (V), cuya secuencia de aminoácidos varía de una especie de anticuerpo a otra, y una porción constante (C), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica entre todas las cadenas H o L de la misma clase. ¿Cuál es la base genética para la síntesis de polipéptidos que tienen una combinación de secuencias de aminoácidos únicas y compartidas?

En 1965, William Dreyer, del Instituto de Tecnología de California y J. Claude Bennett, de la Universidad de Alabama, presentaron la hipótesis de "dos genes-un polipéptido" para explicar la estructura del anticuerpo. En esencia, Dreyer y Bennett propusieron que cada cadena de anticuerpo está codificada por dos genes separados, un gen C y un gen V, que de alguna manera se combinan para formar un "gen" continuo que codifica una única cadena ligera o pesada. En 1976, Susumu Tonegawa, que trabajaba en un instituto de investigación en Basilea, Suiza, proporcionó pruebas claras a favor de la hipótesis de reordenamiento del DNA. El esquema básico del experimento se muestra en la **FIGURA 17-17**. En este experimento, Tonegawa y sus colegas compararon la longitud del DNA entre las secuencias de nucleótidos que codificaron las porciones C y V de una cadena de anticuerpo específica en dos tipos diferentes de células de ratón: células embrionarias tempranas y células de mieloma malignas productoras de anticuerpos. Los segmentos de DNA que codifican las porciones C y V del anticuerpo se separaron ampliamente en DNA embrionario, pero estaban muy cerca el uno del otro en el DNA obtenido de células de mieloma productoras de anticuerpos (véase figura 17-17). Estos hallazgos sugieren fuertemente que los segmentos de DNA que codifican las partes de las moléculas de anticuerpo se reorganizaron durante la formación de las células productoras de anticuerpos.

La investigación posterior reveló la disposición precisa de las secuencias de DNA que dan lugar a genes de anticuerpos. Para simplificar la explicación, consideraremos solo las secuencias de DNA involucradas en la formación de cadenas ligeras kappa humanas, que se encuentran en el cromosoma 2. La organización de secuencias en el DNA de la línea germinal (es decir, el DNA de un espermatozoide o huevo) que están involucrados en la formación de cadenas ligeras kappa humanas se muestra en la línea superior (etapa 1) de la **FIGURA 17-18**. En este caso, una variedad de genes $V_k$ diferentes se localizan en una matriz lineal y se separan de un único gen $C_k$ a cierta distancia. El análisis de la secuencia de nucleótidos de estos genes V indicó que son más cortos que los requeridos para codificar la región V de la cadena ligera kappa. La razón quedó clara cuando se secuenciaron otros segmentos de la región. El tramo de nucleótidos que codifica los 13 aminoácidos en el extremo carboxilo de una región V está situado a cierta distancia del resto de la secuencia del gen V. Esta pequeña porción que codifica el extremo carboxilo de la región V se denomina *segmento J*. Como se muestra en la figura 17-18, hay cinco segmentos $J_k$ distintos de secuencia de nucleótidos relacionados dispuestos en tándem. El grupo de segmentos $J_k$ está separado del gen $C_k$ por un tramo adicional de más de 2 000 nucleótidos. Se forma un gen kappa V completo, como se muestra en la figura 17-18 (etapas 2-3), ya que un gen $V_k$ específico se une a uno de los segmentos $J_k$ con el DNA intervenido escindido. Este proceso es catalizado por un complejo proteico llamado *V(D)J recombinasa*. Como se indica en la figura 17-18, la secuencia del gen $V_k$ generada por esta transposición del DNA aún está separada del gen $C_k$ en más de 2 000 nucleótidos. No se produce una reorganización adicional del DNA en el ensamblaje del gen kappa antes de la transcripción; toda la región genética se transcribe en un transcrito primario grande (etapa 4) a partir del cual los intrones se extirpan mediante corte y empalme de RNA (etapa 5).

El reordenamiento comienza cuando se realizan cortes bicatenarios en el DNA entre un gen V y un gen J. Los cortes son catalizados por un par de proteínas llamadas RAG1 y RAG2 que son las partes activas de la recombinasa V(D)J. Los cuatro extremos libres que se generan se unen de tal manera que los segmentos de codificación V y J se unen para formar un exón que codifica la región variable de la cadena polipeptídica, mientras que los dos extremos del DNA intermedio se unen para formar una pequeña

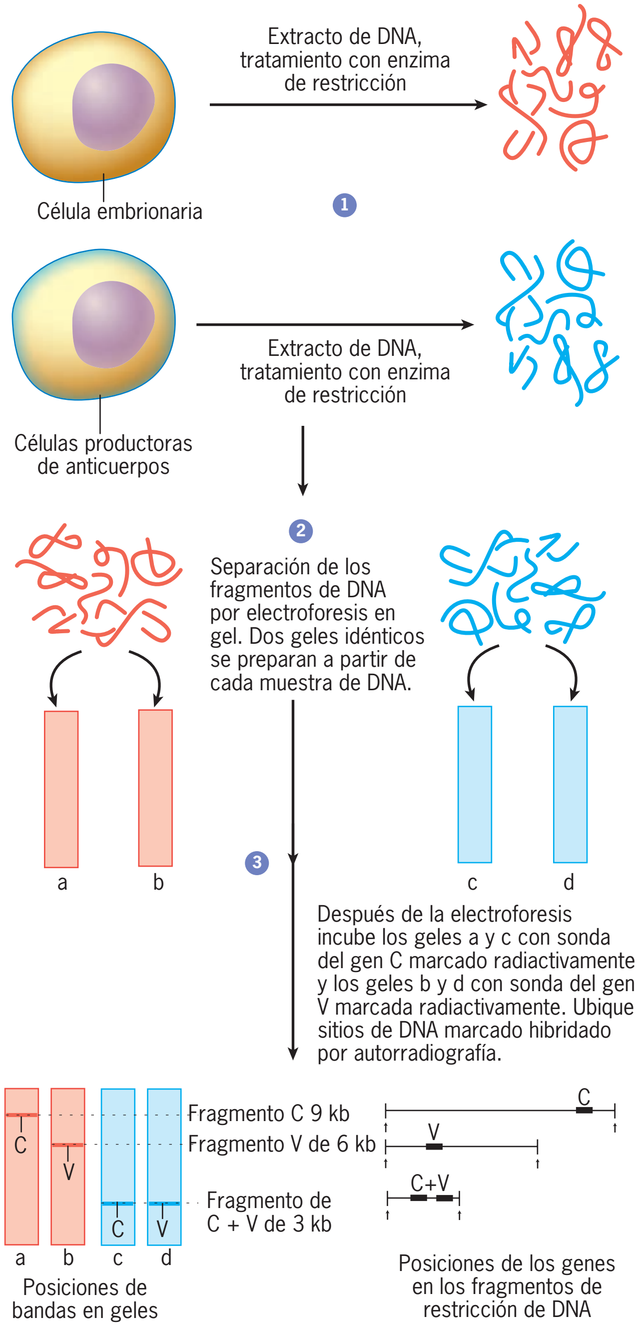



**FIGURA 17-17 Demostración experimental de que los genes que codifican las cadenas ligeras de anticuerpos se forman por reordenamiento del DNA**. El DNA se extrae primero de células embrionarias o células cancerígenas productoras de anticuerpos y se fragmenta mediante una endonucleasa de restricción (etapa 1) que escinde ambas hebras del DNA en una secuencia específica. Los fragmentos de DNA de las dos preparaciones se fraccionan por separado mediante electroforesis en gel; dos geles idénticos se preparan a partir de cada muestra de DNA (etapa 2). Después de la electroforesis, cada uno de los geles se incuba con una sonda marcada que contiene la secuencia del gen variable (V) o constante (C) (etapa 3). La ubicación del DNA marcado y etiquetado en el gel se revela mediante autorradiografía y se muestra en la parte inferior de la figura. Mientras que las secuencias del gen V y C están ubicadas en fragmentos separados en el DNA de células embrionarias, las dos secuencias están ubicadas en el mismo fragmento pequeño en el DNA de las células productoras de anticuerpos. Las secuencias de los genes V y C se unen durante el desarrollo de las células B mediante un proceso de reordenamiento del DNA.

pieza circular de DNA que se desplaza del cromosoma (véase figura 17-18, etapa 3). La unión de los extremos de DNA roto se logra mediante el mismo proceso básico utilizado para reparar las roturas de cadena de DNA que fue ilustrado en la figura 13-28.

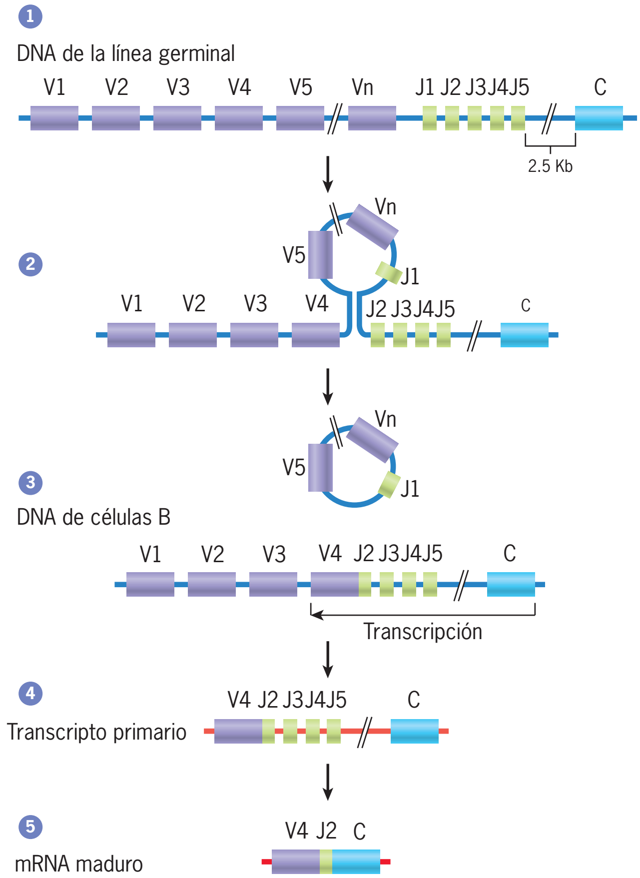



**FIGURA 17-18 Reordenamientos del DNA que conducen a la formación de un gen funcional que codifica una cadena κ de inmunoglobulina.** La organización de las secuencias de DNA variable (V), de unión (J) y constante (C) dentro del genoma se muestra en la etapa 1. Los pasos que conducen a la síntesis del mRNA maduro que codifica el polipéptido de la cadena κ se describen en el texto. La unión aleatoria de un segmento V y J (etapas 2 y 3) determina la secuencia de aminoácidos del polipéptido. El espacio entre el segmento J "elegido" y el segmento C (que puede contener uno o más segmentos J, como se muestra en la figura) permanece como un intrón en el gen. La porción del transcrito primario (etapa 4) que corresponde a este intrón se elimina durante el procesamiento del RNA (etapa 5). El reordenamiento del DNA y la subsiguiente transcripción del gen "renaturalizado" se produce en un solo alelo en cada célula, lo que asegura que la célula expresará solo una única cadena κ. El otro alelo en el cromosoma homólogo normalmente permanece inalterado y no se transcribe.

El reordenamiento de las secuencias de DNA Ig tiene importantes consecuencias para un linfocito. Una vez que una secuencia $V_k$ específica se une a una secuencia $J_k$, ninguna otra especie de cadena kappa puede ser sintetizada por esa célula. Se estima que el DNA de las células germinales humanas contiene aproximadamente 40 genes $V_k$ funcionales. Por tanto, si suponemos que cualquier secuencia V puede unirse a cualquier secuencia J, esperamos que una persona pueda sintetizar aproximadamente 200 cadenas kappa diferentes (5 segmentos $J_k$ de genes $\times$ 40 $V_k$). Pero esta no es la única fuente de diversidad entre estos polipéptidos. El sitio donde se une una secuencia J a una secuencia V puede variar algo de un reordenamiento a otro de manera que los mismos genes $V_k$ y $J_k$ puedan unirse en dos células diferentes para producir cadenas ligeras kappa que tengan diferentes secuencias de aminoácidos. Se logra una variabilidad adicional mediante la enzima desoxinucleotidil transferasa, que inserta nucleótidos en los sitios de rotura de la hebra. Estas fuentes de variabilidad adicional aumentan la diversidad de las cadenas kappa diez veces más, produciendo un número de al menos 2 000 especies. El sitio en el que se unen las secuencias V y J es parte

de una de las regiones hipervariables de cada polipéptido de anticuerpo (véase figura 17-15). Por tanto, las diferencias leves en un sitio de unión pueden tener efectos importantes sobre la interacción anticuerpo-antígeno.

Hemos limitado nuestra explicación a las cadenas ligeras kappa con el objetivo de ilustrar nuestro análisis de forma adecuada. Tipos similares de reordenamientos de DNA ocurren durante el compromiso de una célula con la síntesis de una cadena ligera lambda particular y una cadena pesada particular. Considerando que las regiones variables de las cadenas ligeras se forman a partir de dos segmentos distintos (segmentos V y J), las regiones variables de las cadenas pesadas se forman a partir de tres segmentos distintos (V, D y J) por tipos similares de reordenamiento. El reordenamiento del DNA del *locus* de la cadena pesada precede al del DNA del *locus* de la cadena ligera. El genoma humano contiene 51 segmentos $V_H$ funcionales, 25 segmentos $D_H$ y 6 segmentos $J_H$. Dada la diversidad adicional que se deriva de la variabilidad en las uniones $V_H$-$D_H$ y $D_H$-$J_H$, una persona puede sintetizar al menos 100 000 cadenas pesadas diferentes. Los receptores antigénicos de las células T (TCR) también consisten en un tipo de cadena pesada y ligera, cuyas regiones variables están formadas por un proceso similar de reordenamiento del DNA.

La formación de genes de anticuerpos por reordenamiento del DNA ilustra el potencial del genoma para participar en actividades dinámicas. Debido a este mecanismo de reordenamiento, un puñado de secuencias de DNA que están presentes en la línea germinal puede dar lugar a una notable diversidad de productos genéticos. Como se mencionó anteriormente, una persona sintetiza aproximadamente 2 000 especies diferentes de cadenas ligeras kappa y 100 000 diferentes especies de cadenas pesadas. Si cualquier cadena ligera kappa puede combinarse con cualquier cadena pesada, una persona puede producir teóricamente más de 200 millones de especies diferentes de anticuerpos de unos pocos cientos de elementos genéticos presentes en la línea germinal.[3]

Hemos visto cómo la diversidad de anticuerpos proviene de 1) la presencia de exones V múltiples, exones J y exones D en el DNA de la línea germinal, 2) variabilidad en la unión V–J y V–D–J, y 3) la inserción enzimática de nucleótidos. Un mecanismo adicional para generar diversidad de anticuerpos, conocido como *hipermutación somática*, ocurre mucho después de que se completa el reordenamiento del DNA. Cuando un antígeno específico se reintroduce en un animal después de un periodo, los anticuerpos producidos durante la respuesta secundaria tienen una afinidad mucho mayor por el antígeno que los producidos durante la respuesta primaria. El aumento de la afinidad se debe a pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas de anticuerpos pesadas y ligeras. Estos cambios de secuencia se producen a partir de mutaciones en los genes que codifican estos polipéptidos. Se estima que los elementos de DNA reordenados que codifican las regiones V del anticuerpo tienen una tasa de mutación de $10^5$ veces mayor que la de otros *loci* genéticos en la misma célula. Incluida en el mecanismo responsable de este nivel incrementado de la mutación de la región V 1) una enzima, conocida como citosina desaminasa inducida por activación (AID): que convierte los residuos de citosina en el DNA en los residuos de uracilo que llevan a desajustes de U:G y mutaciones posteriores durante la reparación del DNA y 2) una o más DNA polimerasas translesión (véase página 535) que tienden a cometer errores cuando el DNA que contiene uracilos se copia o repara. Las personas que portan mutaciones en AID y son incapaces de generar hipermutación somática están plagadas de infecciones y con frecuencia mueren a una edad temprana.

La hipermutación somática genera cambios aleatorios en las regiones V de los genes Ig. Aquellas células B cuyos genes producen moléculas de Ig con mayor afinidad por el antígeno se seleccionan preferentemente después de la reexposición del antígeno. Las células seleccionadas proliferan para formar clones que se someten a rondas adicionales de mutación y selección somáticas, mientras que las células no seleccionadas que expresan Ig de baja afinidad experimentan apoptosis. De esta manera, la respuesta de los anticuerpos a las infecciones recurrentes o crónicas mejora notablemente con el tiempo.

[3] Un número aproximadamente comparable de anticuerpos que contienen cadenas ligeras lambda pueden también ser generadas.

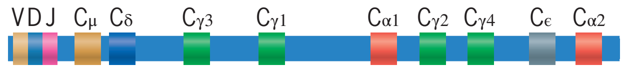



**FIGURA 17-19 Disposición de los genes C para las diversas cadenas pesadas humanas.** En los humanos, las cadenas pesadas de IgM, IgD e IgE están codificadas por un solo gen, mientras que las de IgG están codificadas por cuatro genes diferentes e IgA por dos genes diferentes (véase nota al pie, página 679).

Una vez que una célula B se compromete a formar un anticuerpo específico, puede cambiar la clase de Ig que produce (p. ej., de IgM a IgG) cambiando la cadena pesada producida en la célula. Este proceso, conocido como *cambio de clase*, ocurre sin cambiar el sitio de combinación de los anticuerpos sintetizados. Recuerde que hay cinco tipos diferentes de cadenas pesadas que se distinguen por sus regiones constantes. Los genes que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas (porciones $C_H$) se agrupan en un complejo, como se muestra en la **FIGURA 17-19**. El cambio de clase se realiza moviendo un gen $C_H$ diferente al lado del gen VDJ que se formó previamente por reordenamiento del DNA. El cambio de clase está bajo la dirección de las citocinas secretadas por las células T colaboradoras durante su interacción con las células B que producen la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, una célula T colaboradora que secreta IFN-γ, induce un cambio en la célula B adyacente de su síntesis inicial de IgM a la síntesis de una de las clases de IgG (véase figura 17-13). El cambio de clase permite un linaje de las células B para continuar produciendo anticuerpos que tienen la misma especificidad pero diferentes funciones efectoras (véase página 680).

**REPASO**

1. Dibuje la disposición básica de los genes de la línea germinal que intervienen en la codificación de las cadenas ligeras y pesadas de una molécula de IgG. ¿En qué se diferencian de su disposición en el genoma de una célula productora de anticuerpos? ¿Qué pasos se llevan a cabo para este reordenamiento del DNA?
2. Cite tres mecanismos diferentes que contribuyen a la variabilidad en las regiones V de las cadenas de anticuerpos.

## 17.9 Complejos de receptores de antígeno unido a membrana

El reconocimiento del antígeno por los linfocitos B y T ocurre en la superficie de la célula. Un receptor de antígeno en una célula B (un receptor de células B o BCR) consiste en una inmunoglobulina unida a la membrana que se une selectivamente a una porción de un antígeno intacto (es decir, el epítopo) (véase **FIGURA 17-20*a***). En contraste, el receptor de antígeno en una célula T (un receptor de células T o TCR véase figura 17-20*b*) reconoce y se une a un pequeño fragmento de un antígeno, típicamente un péptido de aproximadamente 7 a 25 aminoácidos de longitud, que se mantiene en la superficie de otra célula (descrita más adelante). Ambos tipos de receptores de antígeno son parte de complejos de proteínas unidas a membranas que incluyen proteínas invariantes como se muestra en la figura 17-20. Los polipéptidos invariantes asociados con BCR y TCR desempeñan un papel clave en la transmisión de señales al interior que conducen a cambios en la actividad de la célula B o la célula T.

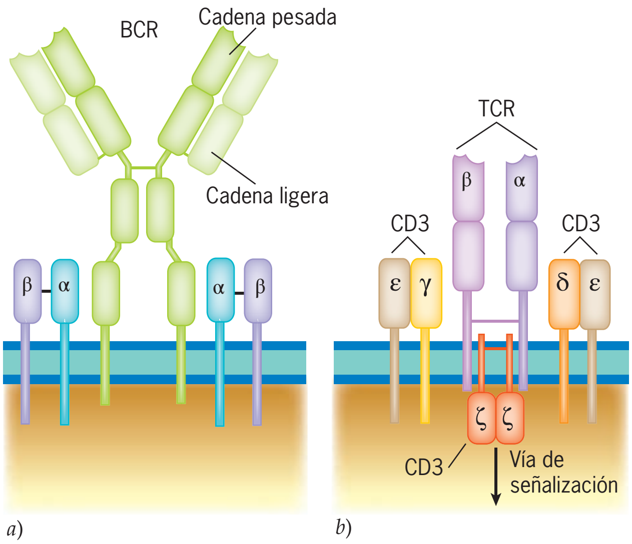



**FIGURA 17-20 Estructura de los receptores de antígeno de una célula B y una célula T.** *a*) El BCR de una célula B es una versión unida a la membrana de una inmunoglobulina asociada con un par de cadenas α invariantes y un par de cadenas β invariantes. Las cadenas α y β también son miembros de la superfamilia Ig. *b*) El TCR de una célula T consiste en una cadena polipeptídica unida entre sí por un puente disulfuro. Cada polipéptido contiene un dominio variable que forma el sitio de unión a antígeno y un dominio constante. El TCR está asociado con otros seis polipéptidos invariantes de la proteína CD3. (Una pequeña fracción de células T contiene un tipo diferente de TCR que consiste en una subunidad γ y una subunidad δ. Estas células no están restringidas al reconocimiento de complejos MHC-péptido, y su función no se comprende bien.)

Cada subunidad de un TCR contiene dos dominios similares a Ig, indicando que comparten un ancestro común con BCR. Al igual que las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, uno de los dominios similares a Ig de cada subunidad de un TCR tiene una secuencia de aminoácidos variable; el otro dominio tiene una secuencia de aminoácidos constante (véase figura 17-20). Los estudios cristalográficos de rayos X han demostrado que los dos tipos de receptores de antígeno también comparten una forma tridimensional similar.

**REPASO**

1. Compare y contraste la estructura de los receptores de antígeno en células B y T.

## 17.10 El complejo principal de histocompatibilidad

Durante la primera parte del siglo xx, los investigadores clínicos descubrieron que la sangre podía transfundirse de una persona a otra, siempre y cuando los dos individuos fueran compatibles por el sistema de grupo sanguíneo ABO. El éxito de la transfusión de sangre condujo a la propuesta de que la piel también podría ser injertada entre individuos. Esta idea se puso a prueba durante la Segunda Guerra Mundial cuando se implantaron injertos de piel en pilotos y otros miembros del personal militar que habían sufrido quemaduras graves. Los injertos fueron rechazados rápida y completamente. Después de la guerra, los investigadores se dispusieron a determinar las causas del rechazo de tejidos. Se descubrió que la piel podía injertarse con éxito entre ratones de la misma cepa pura, pero que los injertos entre ratones de diferentes cepas se rechazaban rápidamente. Los ratones de la misma cepa consanguínea son como gemelos idénticos; son genéticamente idénticos. Estudios posteriores revelaron que los genes que regían el rechazo del injerto de tejido se agruparon en una región del genoma que se denominó **complejo principal de histocompatibilidad** (MHC). Se han caracterizado aproximadamente 20 genes MHC diferentes, la mayoría de los cuales son altamente polimórficos: se han identificado más de 7 000 alelos diferentes de genes MHC (es decir, *HLA*), mucho más que cualquier otro *loci* en el genoma humano. Por tanto, es muy poco probable que dos individuos en una población tengan la misma combinación de alelos MHC. Esta es la razón por la que los órganos trasplantados son tan propensos a ser rechazados y los pacientes trasplantados deben ser tratados con fármacos, como la ciclosporina A, para suprimir el sistema inmune después de la cirugía. La ciclosporina A es un péptido cíclico producido por un hongo del suelo. La ciclosporina A inhibe una fosfatasa particular en la vía de señalización que conduce a la producción de citocinas necesarias para la activación de las células T. Aunque estos fármacos ayudan a prevenir el rechazo del injerto, hacen que los pacientes sean susceptibles a infecciones oportunistas similares a las que afectan a las personas con enfermedades de inmunodeficiencia como el sida.

Es obvio que las proteínas codificadas por el MHC no evolucionaron para prevenir el trasplante indiscriminado de órganos, lo que plantea la cuestión de su rol normal. Mucho después de su descubrimiento como antígenos de trasplante, se mostró que las proteínas MHC estaban involucradas en la presentación de antígenos. Algunos de los experimentos clave que llevaron a nuestra comprensión actual de la presentación de antígenos se analizan en Vías experimentales (17.5).

Anteriormente, se observó que las células T se activan por un antígeno que se ha fragmentado en pequeños péptidos y se muestra en la superficie de una célula presentadora de antígeno (una APC). Estos pequeños fragmentos de antígeno se sostienen en la superficie de la APC en el surco de las proteínas MHC. Cada especie de molécula MHC puede unirse a un gran número de pép-

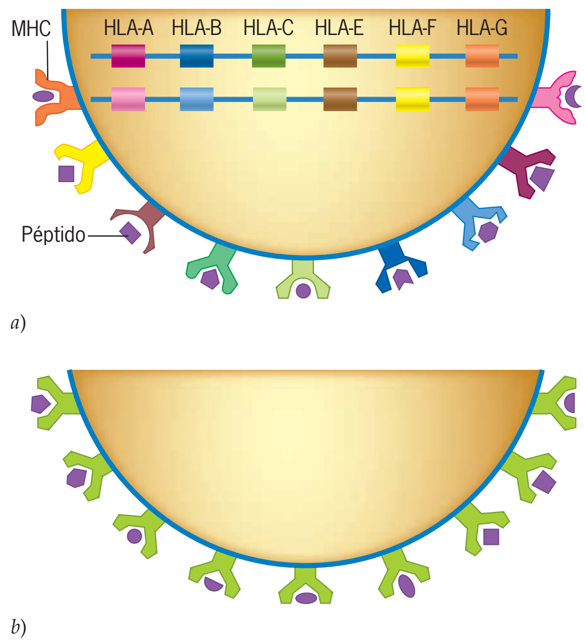



**FIGURA 17-21 Las APC humanas pueden presentar un gran número de péptidos.** *a*) Modelo esquemático de la variedad de moléculas MHC de clase I que un individuo podría poseer. Esta clase de proteína MHC está codificada por varios genes, tres de los cuales están representados por un gran número de alelos. Este individuo en particular es heterocigoto en los *loci* HLA-A, -B y -C y homocigoto en los *loci* HLA-E, -F y -G, lo que les da un total de nueve moléculas MHC de clase I diferentes. (La diferencia entre los MHC de clases I y II se analiza en la página 685.) *b*) Modelo esquemático que ilustra la variedad de péptidos que puede presentar la proteína codificada por un único alelo MHC. (El término *HLA* es un acrónimo de antígeno leucocitario humano que refleja el descubrimiento de estas proteínas en la superficie de los leucocitos.

tidos diferentes que comparten ciertas características estructurales que les permiten encajar en su sitio de unión (véase figura 17-24). Por ejemplo, todos los péptidos que son capaces de unirse a una proteína codificada por un alelo MHC particular, como HLA-B8, pueden contener un aminoácido específico en determinada posición, lo cual le permite fijarse a la ranura de unión al péptido.

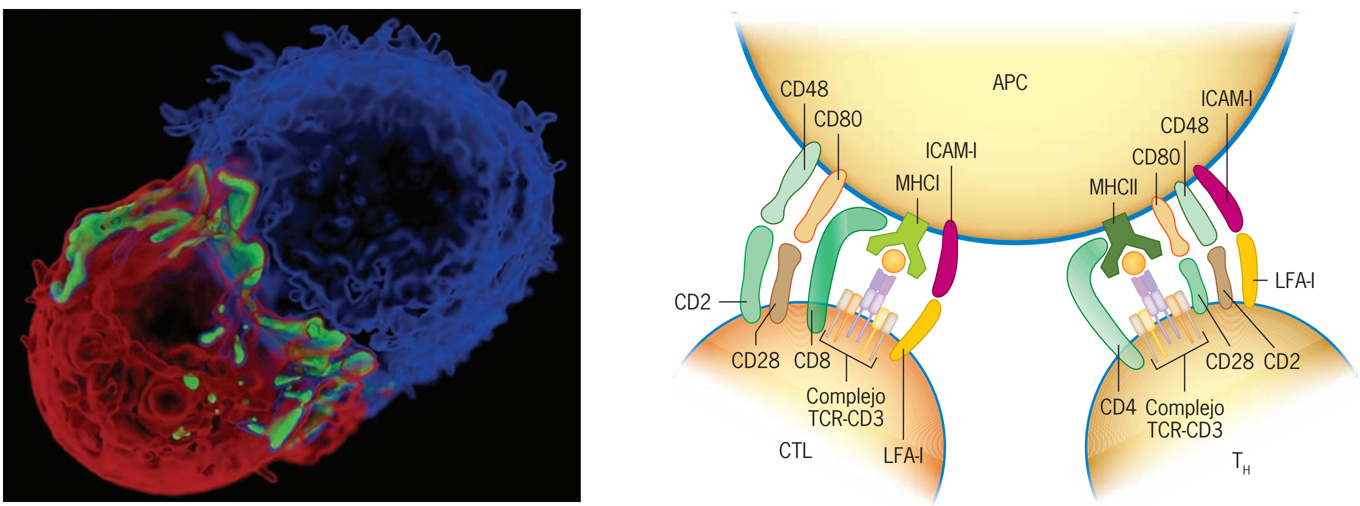
Dado el hecho de que cada individuo expresa una cantidad de proteínas MHC diferentes (como en la **FIGURA 17-21*a***), y cada variante de MHC puede ser capaz de unirse a grandes cantidades de péptidos diferentes (como en la figura 17-21*b*), una célula dendrítica o macrófago debe ser capaz de mostrar una amplia gama de péptidos. Al mismo tiempo, no todas las personas son capaces de presentar todos los péptidos posibles de manera eficaz, lo que se considera un factor importante para determinar las diferencias en la susceptibilidad en una población a diferentes enfermedades infecciosas, incluido sida. Por ejemplo, el alelo HLA B*35 está asociado con una rápida progresión hacia el sida en toda regla y el alelo HLA DRB1*1302 está correlacionado con la resistencia a cierto tipo de malaria y la infección por hepatitis B. Los alelos MHC presentes en una población dada han sido moldeados por selección natural. Aquellas personas que poseen alelos MHC que tienen la mejor capacidad de presentar péptidos de un agente infeccioso particular serán las más propensas a sobrevivir a una infección por ese agente. A la inversa, las personas que carecen de estos alelos tienen más probabilidades de morir sin transmitir sus alelos a su descendencia. Como resultado, las poblaciones tienden a ser más resistentes a las enfermedades a las que sus antepasados han estado expuestos de manera rutinaria. Esto podría explicar por qué las poblaciones nativas americanas han sido devastadas por determinadas enfermedades, como el sarampión, que solo producen síntomas leves en personas de ascendencia europea.

El proceso completo de la inmunidad mediada por células T se basa en que los péptidos pequeños derivados de las proteínas de un patógeno difieren en la estructura de los derivados de las proteínas del huésped. En consecuencia, uno o más péptidos mantenidos en la superficie de una APC sirven como una pequeña representación del patógeno, proporcionando a las células del sistema inmunológico con un "vistazo" del tipo de patógeno que se oculta dentro del citoplasma de la célula infectada. Casi cualquier célula en el cuerpo puede funcionar como una APC. La mayoría de las células presentan el antígeno como una actividad incidental que alerta al sistema inmune de la presencia de un patógeno, pero algunas APC profesionales (p. ej., células dendríticas, macrófagos y células B) están especializadas para esta función, como se explica más adelante en este capítulo.

Cuando una célula T interactúa con una APC, lo realiza haciendo que sus TCR se acoplen a las moléculas MHC que se proyectan desde la superficie de la APC (véase **FIGURA 17-22*b***). Esta interacción trae un TCR de una célula T a una orientación que le permite reconocer el péptido específico mostrado dentro de una ranura de una molécula de MHC (véase figura 17-22*a*). La interacción entre las proteínas MHC y los TCR se ve reforzada por contactos adicionales que se forman entre los componentes de la superficie celular, como ocurre entre las moléculas CD4 o CD8 en una célula T y las proteínas MHC en una APC (véase figura 17-22*b*). Esta región especializada que se desarrolla entre una célula T y una APC se conoce como *sinapsis inmunológica*.

Las **proteínas MHC** se pueden subdividir en dos grupos principales, moléculas **MHC clase I** y **MHC clase II**. Las moléculas del MHC de clase I consisten en una cadena polipeptídica codificada por un alelo MHC (conocido como cadena pesada) asociado no covalentemente con un polipéptido no MHC conocido como microglobulina $\beta_2$ (véase Vía Experimental, figura 1*a*, página 674). Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada son responsables de cambios dramáticos en la forma de la ranura de unión del péptido de la molécula. Las moléculas MHC de clase II también consisten en un heterodímero, pero ambas subunidades están codificadas por alelos MHC. Ambas clases de moléculas de MHC, así como microglobulina $\beta_2$, contienen dominios similares a Ig y, por tanto, son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Mientras que la mayoría de las células del cuerpo expresan moléculas MHC clase I en su superficie, las moléculas MHC de clase II son expresadas principalmente por APC profesionales.

Las dos clases de moléculas MHC muestran antígenos que se originan en diferentes sitios dentro de una célula, aunque puede




*a*) *b*)

**FIGURA 17-22 Interacción entre una célula presentadora de antígeno y una célula T durante la presentación del antígeno.** *a*) Micrografía que muestra la sinapsis inmunológica entre una APC y una célula T modificada por ingeniería genética. La célula presentadora de antígeno se muestra en azul y la célula T se muestra en rojo. La localización de ZAP70, una cinasa que se encuentra en la sinapsis inmunológica, se muestra en verde. *b*) Modelo esquemático que muestra algunas de las proteínas presentes en la sinapsis inmunológica que se forma en la región de interacción entre una APC y linfocito T citotóxico (CTL) o células T ($T_H$) cooperadoras. El reconocimiento del antígeno ocurre cuando el TCR de la célula T reconoce un fragmento peptídico del antígeno unido a una ranura en una molécula de MHC de la APC. Como se analizó en el texto, las CTL reconocen el antígeno en combinación con una molécula de MHC de clase I, mientras que las células $T_H$ reconocen el antígeno en combinación con una molécula de MHC de clase II. CD8 y CD4 son proteínas integrales de membrana expresadas por los dos tipos de células T que se unen a las moléculas MHC de clase I y clase II, respectivamente. CD8 y CD4 se describen como correceptores (Otras numerosas proteínas presentes en estas zonas de interacción célula-célula no se muestran; véase *Nat. Revs. Immunol.* 11: 672, 2011).

FUENTE: *a*) De J.R. James *et al*, *Nature* 487: 64-69. *b*) de L. Chantenoud, *Mol. Med. Today* 4:26, 1998, con permiso de Elsevier.

ocurrir alguna superposición. Las moléculas MHC de clase I son predominantemente responsables de mostrar los antígenos que se originan dentro del citosol de una célula, es decir, proteínas *endógenas.* En contraste, las moléculas MHC de clase II exhiben principalmente fragmentos de antígenos exógenos que se introducen en una célula por fagocitosis. Las vías propuestas por las cuales estas dos clases de moléculas MHC recogen sus fragmentos de antígeno y los muestran en la membrana plasmática son descritos aquí y se revelan en la **FIGURA 17-23**.

- ***Procesamiento de complejos MHC clase I-péptidos*** (véase figura 17-23*a*). Los antígenos ubicados en el citosol de una APC se degradan en péptidos cortos por proteasas que forman parte de los proteasomas de la célula (véase página 510). Estas proteasas escinden proteínas citosólicas en fragmentos de aproximadamente 10 residuos de largo que son adecuados para unirse dentro de una ranura de una molécula de MHC de clase I (véase Figura 17-24*a*). Los péptidos luego se transportan a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso y en su lumen mediante una proteína dimérica llamada TAP (véase figura 17-23*a*). Una vez en el lumen del ER, el péptido puede unirse a una molécula MHC de clase I recién sintetizada, que es una proteína integral de la membrana del ER. El complejo MHC-péptido se mueve a través de la vía biosintética (véase figura 8-2*b*) hasta que llega a la membrana plasmática donde se muestra el péptido.
- ***Procesamiento de complejos MHC clase II-péptidos*** (véase figura 17-23*b*). Las moléculas del MHC de clase II también se sintetizan como proteínas de membrana del RER, pero se unen de manera no covalente a una proteína llamada Ii, que bloquea el sitio de unión al péptido de la molécula del MHC (véase figura 17-23*b*). Siguiendo su síntesis, el complejo MHC clase II-Ii sale del ER a lo largo de la vía biosintética, dirigido por secuencias de localización ubicadas dentro del dominio citoplásmico de Ii. Se cree que las moléculas MHC de clases I y II se separan unas de otras en la red del *trans*Golgi (TGN), que es el compartimiento de clasificación principal a lo largo de la vía biosintética (véase Sección 8.11). Un complejo MHC clase I-péptido se dirige hacia la superficie celular, mientras que un complejo MHC clase II-Ii se dirige hacia una vesícula de transporte que se fusiona con un lisosoma. Allí, la proteína Ii es digerida por proteasas ácidas, dejando solo un pequeño fragmento (CLIP) asociado a la ranura de unión al péptido. El CLIP se intercambia posteriormente con uno de los péptidos derivados de la digestión de antígenos que se introdujeron en la célula a través de la vía endocítica (véase figura 17-23*b*).[4] El complejo MHC clase II-péptido luego se mueve a la membrana plasmática donde se muestra, como se ilustra en la **FIGURA 17-24*b*)**.

Una vez en la superficie de una APC, las moléculas del MHC dirigen la interacción de la célula con diferentes tipos de células T (véase figura 17-22). Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen su antígeno en asociación con las moléculas MHC de clase I; se dice que están *restringidos por la clase I de MHC.* En circunstancias normales, las células del cuerpo que entran en contacto con las CTL muestran fragmentos de sus propias proteínas normales en asociación con sus moléculas MHC de clase I. Las células normales que presentan fragmentos de proteína normales son ignoradas por las células T del cuerpo porque las células T capaces de unirse con alta afinidad a los péptidos derivados de proteínas celulares normales se eliminan a medida que se desarrollan en el timo. En contraste, cuando una célula está infectada, muestra fragmentos de proteínas virales en asociación con sus moléculas MHC de clase I. Estas células son reconocidas por CTL que tienen TCR cuyos sitios de unión son complementarios a los péptidos virales, y la célula infectada se destruye. La presentación de un único péptido extraño en la superficie de una célula es probablemente suficiente para invitar a un ataque por un CTL. Debido a que prácticamente todas las células del cuerpo expresan moléculas MHC de clase I en su superficie, los CTL pueden combatir una infección independientemente del tipo de célula afectada. Los CTL también pueden reconocer y destruir células que muestran proteínas anormales (mutadas) en sus superficies, las cuales pueden desempeñar una función en la eliminación de las células tumorales que amenazan potencialmente la vida.

En contraste con los CTL, las células T cooperadoras reconocen su antígeno en asociación con las moléculas MHC de clase II; se dice que están *restringidos por MHC clase II.* Como resultado, las células T colaboradoras se activan principalmente por antígenos exógenos (es decir, extracelulares) (véase figura 17-23*b*), como los que se producen como parte de las paredes celulares bacterianas o toxinas bacterianas. Las moléculas MHC de clase II se encuentran predominantemente en células B, células dendríticas y macrófagos. Estas son las células linfoides que internalizan materiales extraños extracelulares y presentan los fragmentos a las células T cooperadoras. Las células T cooperadoras que se activan de esta manera pueden estimular las células B para que produzcan anticuerpos solubles que se unen al antígeno exógeno en cualquier lugar del cuerpo.

**REPASO**

1. Describa los pasos en el procesamiento de un antígeno citosólico en una APC. ¿Cuál es el papel de las proteínas MHC en este proceso?
2. Compare y contraste los roles de una molécula de proteína MHC de clase I y una de clase II. ¿Qué tipos de APC utiliza cada clase de molécula MHC y qué tipos de células los reconocen?

## 17.11 Distinguiendo propio de no propio

Las células T ganan su identidad en el timo. Cuando una célula madre migra de la médula ósea al timo, carece de las proteínas de la superficie de las células que median en la función de las células T, sobre todo sus TCR. Las células troncales proliferan en el timo para generar una población de progenitores de células T. Cada una de estas células se somete a los reordenamientos de DNA que le permiten producir un TCR específico. Estas células se someten luego a un complejo proceso de selección en el timo que selecciona las células que tienen receptores de células T potencialmente útiles (véase **FIGURA 17-25**). Los estudios sugieren que las células epiteliales del timo producen pequeñas cantidades de una gran variedad de proteínas normalmente restringidas a otros tejidos en todo el cuerpo. La producción de estos antígenos específicos de tejido está bajo el control de un regulador transcripcional especial (llamado AIRE) que está presente solo en el timo. De acuerdo con este modelo, el timo recrea un entorno en el que las células T en desarrollo pueden muestrear proteínas propias que contienen una amplia gama de epítopos únicos del cuerpo. Las células T cuyos TCR tienen una alta afinidad por los péptidos derivados de las propias proteínas del cuerpo se destruyen (véase figura 17-25*a*). Este proceso de *selección negativa* reduce en gran medida la probabilidad de que el sistema inmune ataque sus propios tejidos. Los seres humanos que carecen de un gen *AIRE* funcional sufren de una enfermedad autoinmune grave (llamada APECED), en la que numerosos órganos sufren ataques inmunológicos.

La generación de células T requiere más que una selección negativa. Cuando un TCR interactúa con un péptido extraño en la superficie de una APC, debe reconocer tanto el péptido como

[4] Los péptidos generados en los lisososmas y adheridos a las moléculas MCH clase II tienden a ser más largos (10 a 25 residuos) que aquellos engendrados en los proteasomas y adheridos a las moléculas MCH clase I (típicamente de 8 a 10 residuos).

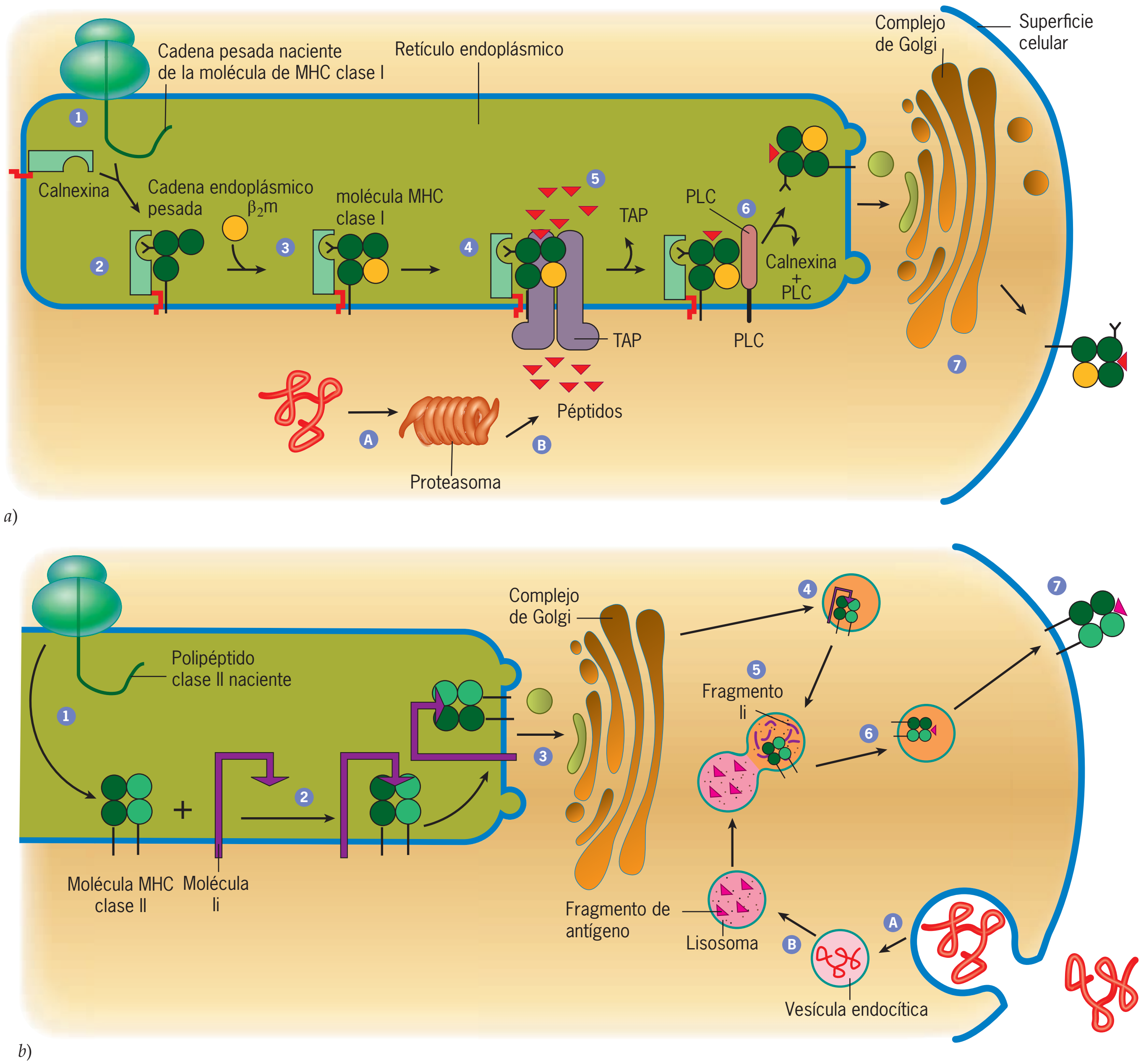
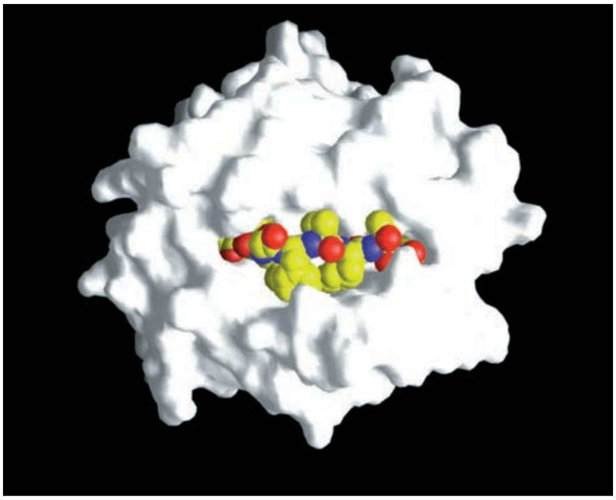
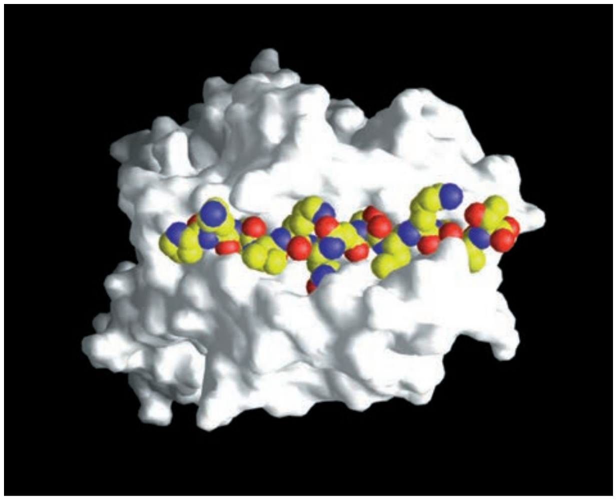



**FIGURA 17-23** **Vías de procesamiento clásicas para antígenos que se asocian con moléculas MHC de clase I y clase II.** *a*) Una vía propuesta para el ensamblaje de un complejo MHC clase I-péptido. Esta vía se produce en casi todos los tipos de células. En la etapa 1, la cadena pesada de la proteína MHC se sintetiza mediante un ribosoma unido a la membrana y se transloca a la membrana ER. La cadena pesada del MHC se asocia con calnexina (etapa 2), una chaperona en la membrana del ER, y el complejo dimérico se une a la cadena invariante de $\beta_2$m (etapa 3). El complejo MHC luego se asocia con otra proteína de membrana ER, TAP (etapa 4). Mientras tanto, los antígenos citosólicos se tornan en proteasomas (etapa A) y se degradan en pequeños péptidos (etapa B). Los péptidos se transportan al lumen ER por la proteína TAP, donde se recortan a su longitud final por una peptidasa ER (no se muestra). Estos péptidos luego se unen dentro de la ranura de la molécula MHC (etapa 5) con la ayuda de un gran complejo de chaperonas que está etiquetado como PLC en la figura. El PLC y la calnexina se disocian del complejo MHC (paso 6), que se transporta a lo largo de la vía biosintética/secretora a través del complejo de Golgi (paso 7) hasta la membrana plasmática, donde está listo para interactuar con el TCR de un CTL. *b*) Una vía propuesta para el ensamblaje de un complejo MHC de clase II-péptido. Esta vía se produce en las células dendríticas y otras APC profesionales. En la etapa 1, la proteína MHC se sintetiza por un ribosoma unido a la membrana y se transloca a la membrana del ER, donde se asocia con Ii (etapa 2), una proteína trimérica que bloquea el sitio de unión péptido-MHC. El complejo MHC pasa a través del complejo de Golgi (etapa 3) y pasa a una vesícula de transporte (etapa 4). Mientras tanto, se toma un antígeno proteico extracelular en la APC por endocitosis (etapa A) y se entrega a un lisosoma (etapa B), donde el antígeno se fragmenta en péptidos. El lisosoma que contiene fragmentos antigénicos se fusiona con la vesícula de transporte que contiene el complejo MHC-Ii (etapa 5), lo que conduce a la degradación de la proteína Ii y la asociación entre el fragmento de péptido antigénico y la molécula del MHC de clase II (etapa 6). El complejo MHC-péptido se transporta a la membrana plasmática (etapa 7) donde está listo para interactuar con el TCR de una célula $T_H$. (*Nota:* No todos los antígenos exógenos siguen la ruta clásica del MHC de clase II que se muestra en la parte *b*. También existe una vía por la cual los antígenos exógenos pueden ser introducidos en las APC por endocitosis y degradados en péptidos, que luego se unen y se muestran mediante moléculas de clase I de MHC. Esta vía de presentación cruzada, como se le llama, permite que los CTL se activen por un antígeno exógeno que de lo contrario, podría ser "invisible".

FUENTE: *a, b*) Después de D. B. Williams *et al*, *Trends Cell Biol*. 6:271, 1996. Trends in Cell Biology por Elsevier Ltd. Reproducido con permiso de Elsevier Ltd. En el formato reutilizado en un libro/libro de texto a través del Centro de Autorización de Derechos de Autor.



*a*)



*b*)

**FIGURA 17-24 Los péptidos producidos por el procesamiento de antígenos se unen dentro de un surco de la molécula de proteína MHC.** Estos modelos ilustran la unión de péptidos a una molécula de MHC de clase I *a*) y MHC de clase II *b*). Las superficies moleculares de las moléculas de MHC se muestran en blanco y el péptido en el sitio de unión del péptido en color. El péptido en a se deriva de la proteína de la matriz del virus de la influenza, y el péptido en b se deriva de la proteína de la hemaglutinina del virus de la influenza. El extremo N de cada péptido está a la izquierda.

FUENTE: *a*, *b*) Cortesía de T. Jardetzky; *Trends Biochem*. Sci. 22:378, 1997, fig. 1, con permiso de Elsevier Science.

la molécula del MHC que contiene ese péptido (descrito en la Sección 17.5). En consecuencia, Las células T cuyos TCR no reconocen sus propias moléculas de MHC tienen poco valor. El sistema inmune elimina esas células al requerir que las células T reconozcan los complejos MHC péptidos propios con baja afinidad. Las células T, cuyos TCR no pueden reconocer los complejos de MHC propios, mueren dentro del timo debido a la falta de señales de crecimiento, un proceso denominado "muerte por negligencia" (figura 17-25*b*). En contraste, las células T cuyos TCR muestran un reconocimiento débil (baja afinidad) hacia los complejos MHC propios se estimulan para que permanezcan vivas, pero no se activan (véase figura 17-25*c*). Este proceso de supervivencia selectiva se conoce como *selección positiva*. Se estima que menos de 5% de las células T tímicas sobrevive a estos eventos de detección.[5]

Se cree que las células que reconocen las moléculas MHC de clase I se convierten en linfocitos T citotóxicos ($CD4^-CD8^+$), mientras que las que reconocen las moléculas MHC de clase II se diferencian en los linfocitos T cooperadores ($CD4^+CD8^-$). Ambos tipos de células T abandonan el timo y circulan durante largos periodos a través de la sangre y la linfa. Las células T en esta etapa se describen como células T *vírgenes* porque aún no se han encontrado con el antígeno específico al que su TCR puede unirse. A medida que pasan a través de los tejidos linfoides, las células T *vírgenes* entran en contacto con varias células que mantienen su supervivencia en estado de reposo o activas.

A medida que se filtran a través de los ganglios linfáticos y otros tejidos, las células T vírgenes exploran las superficies de las células por la presencia de un péptido inadecuado unido a una molécula de MHC. Las células T $CD4^+$ se activan mediante un péptido extraño unido a una molécula MHC de clase II, mientras que las células T $CD8^+$ se activan mediante péptidos extraños unidos a una molécula MHC de clase I. Las células T $CD8^+$ también responden fuertemente a las células que contienen moléculas de MCH no propias, como las células de un órgano trasplantado de un donante no coincidente. En este último caso, inician un ataque generalizado contra las células de injerto que puede ocasionar el rechazo del órgano. En condiciones fisiológicas normales, los linfocitos autorreactivos (es decir, los linfocitos capaces de reaccionar a los tejidos propios del cuerpo) evitan ser activados por una serie de mecanismos poco conocidos que operan fuera del timo en la periferia del cuerpo. Como se analizó en Perspectiva humana, una rotura en estos mecanismos de tolerancia periférica conduce a la producción de autoanticuerpos y células T autorreactivas que pueden causar daño crónico del tejido.

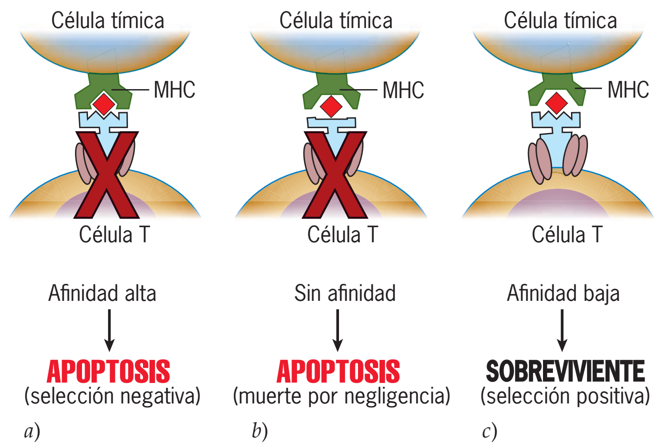



**FIGURA 17-25 Determinación del destino de una célula T formada recientemente en el timo.** Un proceso de detección tiene lugar en el timo que selecciona la célula T con TCR apropiado. *a*) Aquellas células T cuyos TCR exhiben una fuerte afinidad por las moléculas MCH que contienen péptidos propios son eliminadas por apoptosis (selección negativa). *b*) Aquellas células T cuyos TCR fallan para organizar moléculas MCH que contienen péptidos propios también mueren por apoptosis (muerte por negligencia). *c*) Por el contrario, aquellas células T cuyo TCR exhibe afinidad débil por las moléculas MCH que contienen péptidos propios sobreviven (selección positiva) y posteriormente dejan el timo para constituir la población de células T periféricas del cuerpo.

[5] Las células B también se someten a procesos selectivos que conducen a la muerte o inactivación de células capaces de producir anticuerpos autorreactivos. En algunos casos, las cadenas ligeras de los anticuerpos autorreactivos pueden ser reemplazadas por una nueva cadena ligera codificada por un gen Ig que se ha reorganizado de forma secundaria en un proceso llamado edición de receptores.

## REPASO

1. Describa el papel de la selección negativa y positiva en el desarrollo de células T.

## 17.12 Los linfocitos se activan por señales de superficie celular

Los linfocitos se comunican con otras células a través de una serie de proteínas de superficie celular. Como se analizó anteriormente, la activación de las células T requiere una interacción entre el TCR de la célula T y un complejo MHC-péptido en la superficie de otra célula. Esta interacción proporciona especificidad, lo que garantiza que solo se activen las células T que se unen al antígeno. La activación de las células T también requiere una segunda señal, llamada *señal coestimuladora*, que se administra a través de un segundo tipo de receptor en la superficie de una célula T. Este receptor es distinto y está espacialmente separado del TCR. A diferencia del TCR, el receptor que entrega la señal coestimuladora no es específico para un antígeno particular y no requiere una molécula de MHC para unirse. La interacción mejor estudiada ocurre entre las células T cooperadoras y las células presentadoras de antígenos profesionales (p. ej., células dendríticas y macrófagos).

### Activación de células T cooperadoras por APC profesionales

Las células $T_H$ reconocen los fragmentos de antígeno en la superficie de las células dendríticas y los macrófagos que se alojan en la hendidura de unión de las moléculas MHC de clase II. Una señal coestimuladora se envía a una célula $T_H$ como resultado de una interacción entre una proteína conocida como CD28 en la superficie de la célula $T_H$ y un miembro de la familia de proteínas B7 en la superficie de la APC (véase **FIGURA 17-26*a***). La proteína B7 aparece en la superficie de la APC después de que el fagocito ingiera antígeno extraño. Si la célula $T_H$ no recibe esta segunda señal de la APC, en lugar de activarse, la célula $T_H$ no responde (se anergiza) o se estimula para provocar la apoptosis. Debido a que las APC profesionales son las únicas células capaces de entregar la señal coestimuladora, son las únicas células que pueden iniciar una respuesta de $T_H$. Como resultado, las células normales del cuerpo que contienen proteínas capaces de combinarse con los TCR de una célula T no pueden activar las células $T_H$. Por tanto, el requerimiento de una célula $T_H$ para dos señales de activación protege a las células normales del cuerpo del ataque autoinmune que involucra a las células $T_H$.

Antes de su interacción con una APC, una célula $T_H$ puede describirse como una célula inactiva, es decir, una que se ha retirado del ciclo celular (una célula $G_0$, página 542). Una vez que recibe las señales de activación dual, una célula $T_H$ se estimula para volver a entrar en la fase $G_1$ del ciclo celular y, finalmente, para progresar a través de la fase S hacia la mitosis. Por tanto, la interacción de las células T con un antígeno específico conduce a la proliferación (*expansión clonal*) de aquellas células capaces de responder a ese antígeno. Además de desencadenar la división celular, la activación de una célula $T_H$ provoca la síntesis y secreción de citocinas (especialmente IL 2). Las citocinas producidas por las células $T_H$ activadas actúan sobre otras células del sistema inmune (incluidas las células B y los macrófagos) y también sobre las células $T_H$ secretadas por las moléculas. El origen y la función de varias citocinas son expuestas en la tabla 17-1.

Hemos visto en este capítulo cómo *las* respuestas inmunes son estimuladas por los ligandos que activan las vías de señalización del receptor. Pero muchos de estos eventos también están influenciados por estímulos inhibitorios, de modo que la respuesta final de la célula está determinada por un balance de influencias positivas y negativas. Por ejemplo, la interacción entre CD28 y una proteína B7 transmite una señal positiva a la célula T que lleva a su activación. La activación de la célula T conduce a la circulación de una proteína llamada CTLA4 desde las membranas intracelulares a la superficie celular. CTLA4 es similar a CD28 en su estructura y también interactúa con las proteínas B7 de la APC. Sin embargo, a diferencia de la interacción CD28-B7, el contacto entre CTLA4 y B7 conduce a la inhibición de la respuesta de las células T, en lugar de la activación. Se cree que CTLA4 desempeña un papel en el mantenimiento de la tolerancia de las células T periféricas. La necesidad de equilibrio entre la activación y la inhibición es más evidente en ratones que han sido diseñados genéticamente para carecer del gen que codifica CTLA4. Estos ratones mueren como resultado de la sobreproliferación masiva de células T. Tal como se indica en la página 670, la comprensión sobre la función de CTLA4 se ha puesto recientemente en uso clínico.

### Activación de las células B por las células $T_H$

Las células $T_H$ se unen a las células B cuyos receptores reconoce el mismo antígeno. Inicialmente, el antígeno se une a la inmunoglobulina (BCR) en la superficie de las células B. Los antígenos captados por las células B pueden ser proteínas solubles del medio extracelular o proteínas unidas a la membrana plasmática de otras células. En este último caso, la célula B obtiene el antígeno al extenderse sobre la superficie externa de la célula blanco y recolectar los complejos de antígeno-BCR en un conjunto central. El antígeno unido se captura luego en la célula B, donde se procesa enzimáticamente, y sus fragmentos se muestran en combinación con moléculas MHC de clase II (véase figura 17-26*b*). La célula B con péptidos antigénicos desplegados recluta una célula $T_H$ con el TCR apropiado (cognado). El reconocimiento del fragmento peptídico por el TCR conduce a la activación de la célula $T_H$, que responde activando la célula B. La activación de una célula B sigue la transmisión de varias señales de la célula $T_H$ a la célula B. Algunas de estas señales se transmiten directamente de una superficie celular a otra a través de una interacción entre proteínas complementarias, como las moléculas CD40 y CD40 ligando (CD40L) (véase figura 17-26*b*). La unión entre CD40 y CD40L genera señales que ayudan a mover la célula B del estado de reposo $G_0$ al ciclo celular. Otras señales son transmitidas por las citocinas liberadas por la célula T en la sinapsis inmunológica que lo separa de la célula B cercana. Este proceso no es diferente a la forma en que los neurotransmisores actúan a través de una sinapsis neural (véase Sección 4.18). Las citocinas liberadas por las células T en la sinapsis inmunológica incluyen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Se piensa que la interleucina 4 estimula a las células B a pasar de producir la clase IgM a producir las clases IgG o IgE. Otras citocinas inducen la proliferación, diferenciación y actividades secretoras de las células B.

**REPASO**

1. Describa los pasos entre la etapa cuando una bacteria es ingerida por un macrófago y la etapa cuando las células plasmáticas producen anticuerpos que se unen a la bacteria y neutralizan su infectividad.

## 17.13 Vías de transducción de señales en la activación de linfocitos

Vimos en el capítulo 15 cómo las hormonas, los factores de crecimiento y otros mensajeros químicos se unen a los receptores en las superficies exteRNA de las células blanco para iniciar un proceso de transducción de señales, que transmite información a los compartimientos internos de una célula. En ese capítulo, pudimos observar cómo una gran variedad de moléculas mensajeras extracelulares transmite información a lo largo de un pequeño número de vías de transducción de señales comparti-

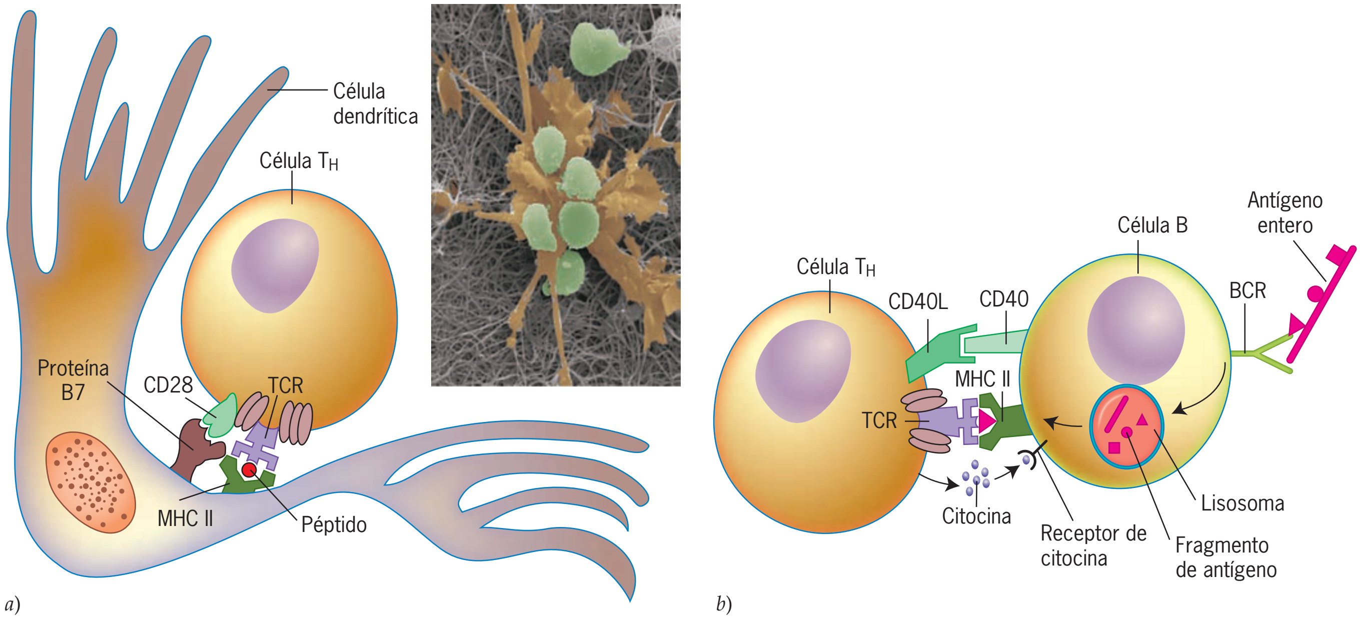



**FIGURA 17-26 Activación de linfocitos.** *a*) Dibujo esquemático que ilustra la interacción entre un APC profesional, en este caso una célula dendrítica madura y una célula $T_H$. Específicamente esta interacción célula-célula se deriva del reconocimiento por el TCR en la célula $T_H$ del complejo MHC clase II-péptido exhibido en la superficie de la célula dendrítica. La interacción entre CD28 de la célula T y la proteína B7 de la célula dendrítica provee una señal coestimuladora no específica que es requerida para la activación de la célula T. (Insertada) Micrografía electrónica de barrido de una célula dendrítica madura (naranja) presentando antígeno a un número de células T(verde). *b*) Dibujo esquemático de la interacción entre una célula $T_H$ activada y una célula B. Específicamente, esta interacción célula-célula se deriva del reconocimiento por el TCR en la célula $T_H$ del complejo MHC clase II-péptido exhibido en la superficie de la célula B. El péptido exhibido por la célula T está derivado de moléculas de proteína que, en principio, se habían unido a las BCR en la superficie de la célula. Estas uniones de antígenos son iniciadas por endocitosis, fragmentadas en lisosomas y unidas a moléculas MHC clase II, como en la figura 17.23*b*.

FUENTE: *a,b*) E. Lindhout *et al; Immunol Today* 18:574, 1997. Immunology Today by Elsevier Sci Ltd/U. K. Reproducido con permiso de Elsevier Sci Ltd/U.K. en el formato reutilizado en libro/libro de texto via Copyright Clearance Center. Foto insertada; de Peter Friedl, *Nature Revs. Immunology* 5:533, 2005, Fig. 1ª, imagen del medio; reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Limited.

das. La estimulación de los linfocitos ocurre por un mecanismo similar y utiliza muchos de los mismos componentes empleados por las hormonas y los factores de crecimiento que actúan sobre otros tipos de células.

Cuando una célula T es activada por una célula dendrítica, o una célula B es activada por una célula $T_H$, las señales son trasmitidas de la membrana plasmática al citoplasma por tirosinas cinasas, de manera similar a las señales descritas en el capítulo 15 para la insulina y los factores de crecimiento. A diferencia de los receptores para la insulina y los factores de crecimiento (véase página 604), los receptores de antígeno de linfocitos carecen de una actividad inherente de tirosina cinasa. En cambio, la unión del ligando a los receptores de antígeno conduce al reclutamiento de moléculas de tirosina cinasa citoplásmica a la superficie interna de la membrana plasmática. Este proceso puede ser facilitado por la agrupación de receptores activados. Se han implicado varias tirosina cinasas diferentes en la transducción de señales durante la activación de los linfocitos, incluidos los miembros de las familias Src y Tec. Src fue la primera tirosina cinasa en identificarse y es el producto del primer oncogen causante de cáncer en ser descubierto (véase página 633).

La activación de estas tirosina cinasas conduce a una cascada de eventos y la activación de numerosas vías de transducción de señales, que incluyen:

1. Activación de la fosfolipasa C, que conduce a la formación de $IP_3$ y DAG. Como se analizó en la página 598, el $IP_3$ causa una elevación marcada en los niveles de $Ca^{2+}$ citosólico, mientras que DAG estimula la actividad de la proteína cinasa C.
2. Activación de Ras, que conduce a la activación de la cascada de MAP cinasa (véase Sección 15.11).
3. Activación de PI3K, que cataliza la formación de mensajeros lipídicos de unión a membrana teniendo diversas funciones en las células (véase página 612).

La transmisión de señales a lo largo de estas diversas vías, y otras, conduce a la activación de varios factores de transcripción (p. ej., NF-κB y NFAT) y la transcripción resultante de docenas de genes que no se expresan en la célula T o en la célula B restante.

Como se señaló anteriormente, una de las respuestas más importantes de un linfocito activado es la producción y secreción de citocinas. Algunas de estas citocinas pueden actuar como parte de un circuito autocrino al unirse a los receptores en la célula que los liberó. Como otras señales extracelulares; las citocinas se unen a los receptores en la superficie externa de las células diana, generando señales citoplásmicas que actúan sobre varios dianas intracelulares. Las citocinas utilizan una nueva vía de transducción de señales conocida como *vía JAK-STAT*, que funciona sin la implicación de segundos mensajeros. La parte "JAK" del nombre es un acrónimo de Janus cinasas, una familia de tirosina cinasas citoplásmicas cuyos miembros se activan luego de la unión de una citocina a un receptor de superficie celular. (Janus es un dios romano de dos caras protector de las entradas y las puertas.) "STAT" es un acrónimo de "transductores de señales y activadores de la transcripción", una familia de factores de transcripción que se activan cuando uno de sus residuos de tirosina se fosforila por una JAK (véase figura 15.19*c*). Una vez fosforiladas, las moléculas STAT interactúan para formar dímeros que se translocan desde el citoplasma al núcleo donde se unen a secuencias específicas de DNA, como un elemento de respuesta estimulada por interferón (ISRE). Los ISRE se encuentran en las regiones reguladoras de una docena más o menos de genes que se activan

cuando una célula está expuesta al interferón α de las citocinas (IFN-α).

Al igual que con las hormonas y factores de crecimiento analizados en el capítulo 15, la respuesta específica de una célula depende del receptor de citocinas particular comprometido y las JAK y STAT particulares que están presentes en esa célula. Por ejemplo, se señaló anteriormente que IL-4 actúa para inducir el cambio de clase de Ig en las células B. Esta respuesta sigue la fosforilación inducida por IL-4 del factor de transcripción STAT6, que está presente en el citoplasma de las células B activadas. La resistencia a la infección viral inducida por interferones (véase página 665) está mediada a través de la fosforilación de STAT1. La fosforilación de otras STAT puede conducir a la progresión de la célula blanco a través del ciclo celular.



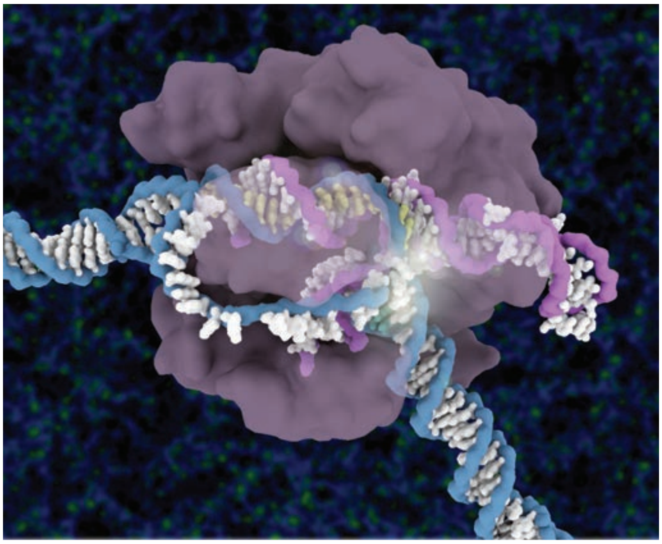


**REPASO**

1. Describa la vía de señalización en los linfocitos que es desencadenada en respuesta a la unión de citocinas.

CAPÍTULO

# 18 Técnicas en biología molecular y celular



Una ilustración de la proteína Cas9, la endonucleasa de DNA guiada por RNA que se utiliza en la edición del genoma basado en CRISPR. La proteína Cas9 (púrpura) se asocia con un RNA guía (columna vertebral púrpura con bases blancas) y explora a lo largo del DNA genómico en busca de un segmento de DNA (cadena principal azul con bases blancas) que coincida con el RNA guía. Cuando encuentra esta coincidencia, divide el DNA en ese punto.

## LA CONFERENCIA DE ASILOMAR

Los rápidos avances en la tecnología del DNA recombinante a principios de la década de 1970 proporcionaron a los investigadores la capacidad de "cortar y pegar" el DNA de diferentes organismos, como los virus y las bacterias, por primera vez. Aunque era evidente el potencial investigativo para tal manipulación del DNA, muchos científicos estaban preocupados por los posibles riesgos que esta nueva tecnología representaba para la salud humana y el medio ambiente. En respuesta, un grupo de investigadores dirigido por el bioquímico de Stanford Paul Berg pidió una moratoria voluntaria internacional sobre los experimentos con el DNA recombinante en 1974. Al año siguiente, Berg y otros organizaron una conferencia internacional en el Centro de Conferencias Asilomar en Pacific Grove, California, para abordar las preocupaciones con respecto al uso de la tecnología del DNA recombinante. La Conferencia de Asilomar de 1975 reunió a 140 biólogos moleculares, abogados, funcionarios gubernamentales y periodistas con el apoyo de los Institutos Nacionales de Salud y la Academia Nacional de Ciencias. Durante varios días, los asistentes discutieron (y argumentaron sobre) los riesgos potenciales asociados con diferentes tipos de experimentos y los métodos para minimizar al máximo estos riesgos. Al final de la reunión, se llegó a un

(*continúa*)

## BOSQUEJO DEL CAPÍTULO


**18.1** El microscopio óptico
**18.2** Microscopía de campo brillante y de contraste de fase
**18.3** Microscopía de fluorescencia (y técnicas relacionadas basadas en la fluorescencia)
**18.4** Microscopía electrónica de transmisión
**18.5** Preparación de las muestras para microscopía electrónica
**18.6** Microscopía electrónica de barrido
**18.7** Microscopía de fuerza atómica
**18.8** El uso de radioisótopos
**18.9** Cultivo celular
**18.10** El fraccionamiento de los contenidos de una célula por centrifugación diferencial
**18.11** Purificación y caracterización de proteínas mediante cromatografía líquida en columna
**18.12** Determinación de proteínas: interacciones de las proteínas
**18.13** Caracterización de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida
**18.14** Caracterización de las proteínas por espectrofotometría
**18.15** Caracterización de las proteínas mediante espectrometría de masas
**18.16** Determinación de la estructura de las proteínas y los complejos multisubunitarios
**18.17** Fraccionamiento de los ácidos nucleicos
**18.18** Hibridación del ácido nucleico
**18.19** Síntesis química del DNA
**18.20** Tecnología del DNA recombinante
**18.21** Amplificación enzimática del DNA por PCR
**18.22** Secuenciación de DNA
**18.23** Bibliotecas de DNA
**18.24** Transferencia de DNA en las células eucariotas y en los embriones de mamíferos
**18.25** Edición genética y silenciamiento
**18.26** El uso de los anticuerpos

acuerdo para levantar la moratoria y permitir que la investigación continuara con un conjunto de restricciones definidas. Las pautas establecidas en la reunión de Asilomar fueron adoptadas por el NIH al año siguiente.

Más recientemente, el desarrollo de las nuevas tecnologías que allanan el camino para la edición del genoma humano ha llevado a los investigadores a considerar la posibilidad de convocar una reunión similar a la histórica conferencia de Asilomar. De particular preocupación ética es el potencial de las técnicas de edición del genoma para ser utilizadas en la ingeniería genética de embriones humanos. En una carta a Science publicada en abril de 2015, un grupo de investigadores dirigido por Jennifer Doudna (Universidad de California, Berkeley) ha pedido una prohibición global de las modificaciones del genoma en las células germinales humanas y un aumento de las discusiones con el público sobre la edición del genoma. La carta también convoca a una reunión de investigadores, especialistas en ética, abogados y público para que se consideren los méritos y riesgos de la edición del genoma, y para recomendar las políticas donde se necesiten.

## 18.1 El microscopio óptico

Debido al tamaño muy pequeño de la materia objeto de análisis, la biología celular y molecular depende más del desarrollo de nuevos instrumentos y tecnologías que cualquier otra rama de la biología. En consecuencia, es difícil aprender sobre la biología celular y molecular sin conocer también sobre la tecnología que se requiere para recopilar los datos. En este capítulo, estudiaremos los métodos más utilizados en este campo sin sumergirnos en los detalles o las muchas variaciones que se emplean. Estos son los objetivos del presente capítulo: describir las formas en que se utilizan las técnicas seleccionadas y proporcionar ejemplos de los tipos de informaciones que se pueden aprender utilizando estas técnicas. Comenzaremos con el instrumento que permitió a los biólogos descubrir la existencia misma de las células, y proporcionar el punto de partida para toda la información que se ha presentado en este texto.

Los microscopios son instrumentos que producen una imagen ampliada de un objeto. La **FIGURA 18-1** muestra los componentes más importantes de un microscopio óptico compuesto. Una fuente de luz, que puede ser externa al microscopio o incorporarse en su base, ilumina la muestra. El lente del condensador en el portaobjeto recoge los rayos difusos de la fuente de luz e ilumina la muestra con un cono pequeño de luz brillante que permite que se vean partes muy pequeñas de la muestra después de la ampliación. Los rayos de luz enfocados en la muestra por el lente del condensador son luego recogidos por el lente objetivo del microscopio. En este punto, tenemos que considerar dos conjuntos de rayos de luz que entran en el lente objetivo: el que la muestra ha alterado y el que no tiene alteración (**FIGURA 18-2**). El último grupo consiste en la luz del condensador que pasa directamente al lente objetivo, formando el fondo de luz del campo visual. El primer grupo de rayos de luz emana de muchas partes de la muestra y forma la imagen de la muestra. Estos rayos de luz son enfocados por el lente objetivo para formar una imagen real y ampliada del objeto dentro de la columna del microscopio (figura 18-1). La imagen formada por el lente objetivo se utiliza como

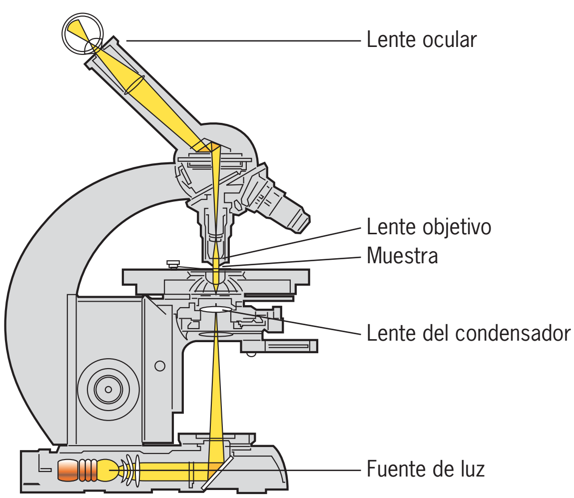



**FIGURA 18-1 Diagrama seccional a través de un microscopio óptico compuesto;** es decir, un microscopio que tiene un lente objetivo y un lente ocular.

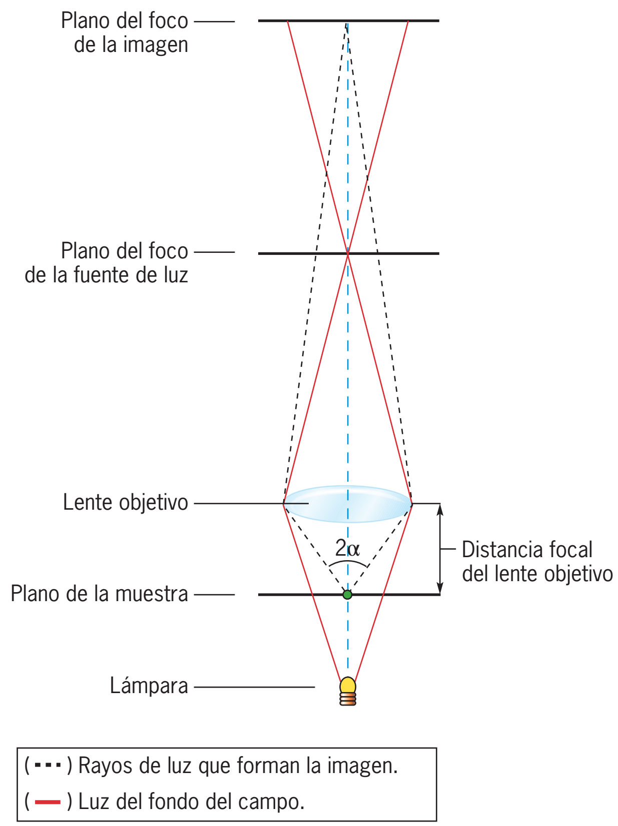



**FIGURA 18-2 Caminos tomados por los rayos de luz que forman la imagen de la muestra y aquellos que forman la luz del fondo del campo.** Los rayos de luz de la muestra se enfocan en la retina, mientras que los rayos del fondo están desenfocados, produciendo un campo difuso brillante. Como se verá más adelante en el texto, el poder de resolución del lente objetivo es proporcional al seno del ángulo. Las lentes con mayor poder de resolución tienen distancias focales más cortas, lo que significa que la muestra se encuentra más cerca del lente objetivo cuando se enfoca.

un objeto mediante un segundo sistema de lente, el lente ocular, para formar una imagen ampliada y virtual. Un tercer sistema de lentes ubicado en la parte frontal del ojo usa la imagen virtual producida por el lente ocular como un objeto para producir una imagen real en la retina. Cuando se gira la perilla de enfoque del microscopio óptico, la distancia relativa entre la muestra y el lente objetivo cambia, permitiendo que la imagen final se enfoque exactamente en el plano de la retina. La ampliación total obtenida por el microscopio es el producto de los aumentos producidos por el lente objetivo y el lente ocular.

## Resolución

Hasta este punto, hemos considerado sólo la ampliación de un objeto sin prestar atención a la calidad de la imagen producida, es decir, la medida en que los detalles de la muestra se conservan en la imagen. Suponga que está mirando una estructura en el microscopio utilizando un lente objetivo de potencia relativamente alta (por ejemplo, 63×) y un lente ocular que magnifica la imagen del lente objetivo cinco veces más (un ocular de 5×). Supongamos que el campo está compuesto de cromosomas y es importante determinar el número presente, pero algunos de ellos están muy juntos y no se pueden distinguir como estructuras separadas (**FIGURA 18-3*a***). Una solución al problema podría ser cambiar los oculares para aumentar el tamaño del objeto que se está viendo. Si cambiara el ocular de 5× a 10×, lo más probable es que aumente su capacidad para determinar el número de cromosomas presentes (figura 18-3*b*) porque ahora ha extendido la imagen de los cromosomas producidos por el lente objetivo sobre una parte mayor de su retina. Cuantos más fotorreceptores proporcionen información sobre la imagen, más detalles podrán verse (**FIGURA 18-4**). Sin embargo, si cambia a un ocular de 20×, no es probable que vea detalles adicionales, aunque la imagen sea más grande (figura 18-3*c*), es decir, ocupa más superficie reticular. El cambio de ocular no proporciona información adicional debido a que la imagen producida por el lente objetivo no posee ningún detalle extra para ser ampliado por el aumento de la potencia del lente ocular. El segundo cambio en los oculares proporciona sólo un *aumento vacío* (como en la figura 18-3*c*).

La calidad óptica del lente objetivo se mide por la extensión a la cual los detalles finos presentes en una muestra pueden ser discriminados o resueltos. La **resolución** alcanzada por un microscopio está limitada por la difracción. Debido a la difracción, la luz que emana de un punto en la muestra nunca se puede ver como un punto en la imagen, sino sólo como un pequeño disco. Si los discos producidos por dos puntos cercanos se superponen, los puntos no se pueden distinguir en la imagen. Por tanto, el poder de resolución de un microscopio se puede definir en términos de la capacidad de ver dos puntos vecinos en el campo visual como dos entidades distintas. El poder de resolución de un microscopio está limitado por la longitud de onda de la iluminación según la ecuación

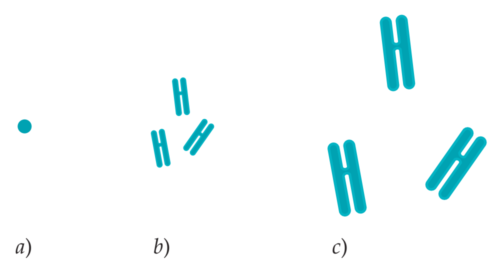



**FIGURA 18-3 Ampliación frente a la resolución.** La transición desde *a*) a *b*) proporciona al observador una mayor ampliación y resolución, mientras que la transición de *b*) a *c*) proporciona sólo incremento de la ampliación (ampliación vacía). De hecho, la calidad de la imagen en realidad se deteriora a medida que la ampliación vacía aumenta.

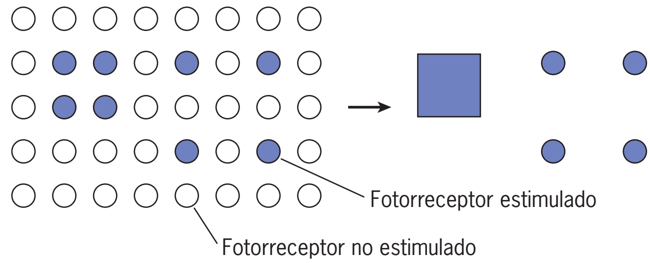



**FIGURA 18-4 El poder de resolución del ojo.** Una ilustración muy esquemática de la relación entre la estimulación de los fotorreceptores del individuo (izquierda) y la escena resultante que uno percibiría (derecha). El diagrama ilustra el valor de hacer que la imagen caiga sobre un área suficientemente grande de la retina.

$$d = \frac{0.61\,\lambda}{n \text{ sen } \alpha}$$

donde $d$ es la distancia mínima que deben separarse dos puntos en la muestra para lograr la resolución, λ es la longitud de onda de la luz (527 nm se usa para la luz blanca), y $n$ es el índice de refracción del medio presente entre la muestra y el lente objetivo. Alpha (α) es igual a la mitad del ángulo del cono de luz que entra en el objetivo, como se muestra en la figura 18-2. Alpha es una medida de la capacidad de captura de luz del lente y está directamente relacionada con su apertura.

El denominador de la ecuación en la columna 1 se llama *apertura numérica* (N. A., *numerical aperture*). La apertura numérica es una constante para cada lente, una medida de sus cualidades para captar la luz. Para un objetivo que está diseñado para su uso en el aire, la N.A. máxima posible es 1.0 porque el seno del ángulo máximo posible de 90° es 1 y el índice de refracción del aire es 1.0. Para un objetivo diseñado para sumergirse en aceite, la N.A. máxima posible es aproximadamente 1.5. Como regla general, el aumento máximo útil de un microscopio óptico oscila entre 500 y 1 000 veces la apertura numérica del lente objetivo que se utiliza. Los intentos de ampliar la imagen más allá de este punto producen una ampliación vacía y la calidad de la imagen se deteriora. Se logra una gran apertura numérica usando lentes con una distancia focal corta, lo que requiere que el lente se coloque muy cerca de la muestra.

Si sustituimos la mínima longitud de onda posible de la iluminación y la mayor abertura numérica posible en la ecuación anterior, podemos determinar el **límite de resolución** del microscopio óptico convencional. Cuando se realizan estas sustituciones, se obtiene un valor ligeramente inferior a 0.2 μm (o 200 nm), que es suficiente para resolver los organelos celulares más grandes, como los núcleos y las mitocondrias. Por el contrario, el límite de resolución del ojo desnudo, que tiene una apertura numérica de unos 0.004, es de aproximadamente 0.1 mm.

Además de estos factores teóricos, la capacidad de resolución también se ve afectada por fallos ópticos o *aberraciones*. Hay siete aberraciones importantes, y son las desventajas que deben superar los fabricantes de lentes para producir los lentes objetivos cuyo poder de resolución real se acerque a los límites teóricos. Los lentes objetivos están hechos de una serie compleja de lentes, en lugar de una sola lente convergente, para eliminar estas aberraciones. Una unidad del lente ofrece normalmente la ampliación requerida, mientras que las otras compensan los errores en el primer lente para proporcionar una imagen general corregida.

## Visibilidad

En el lado más práctico de la microscopía, además de los límites de la resolución, está el tema de la *visibilidad*, que se refiere a los factores que permiten que un objeto sea realmente observado. Esto puede parecer una cuestión trivial; si un objeto está allí, debe verse. Considere el caso de una gota de vidrio transparente. En la mayoría de las condiciones, contra la mayoría de los fondos, la gota es claramente visible. Sin embargo, si se cae una gota de vidrio en un vaso de aceite de inmersión con el mismo índice de refracción que el vidrio, la gota desaparece de la vista porque ya no afecta a la luz de ninguna manera obvia que sea diferente del fluido del fondo. Cualquiera que haya pasado algún tiempo buscando una ameba puede apreciar el problema de la visibilidad cuando usa el microscopio óptico.

Lo que vemos a través de una ventana o un microscopio son aquellos objetos que afectan la luz de forma diferente que su fondo. Otro término para la visibilidad en este sentido de la palabra es el **contraste**, o la diferencia de aspecto entre las partes adyacentes de un objeto o entre un objeto y su fondo. La necesidad del contraste se puede apreciar al considerar las estrellas. Mientras que un cielo nocturno claro puede llenarse de estrellas, el mismo cielo durante el día aparece desprovisto de cuerpos celestes. Las estrellas han desaparecido de la vista, pero no han desaparecido del cielo. Ya no son visibles contra el fondo mucho más brillante.

En el mundo macroscópico, examinamos los objetos haciendo que la luz caiga sobre ellos y luego observamos la luz que se refleja en nuestros ojos. En contraste, cuando usamos un microscopio, colocamos la muestra entre la fuente de luz y nuestros ojos y vemos la luz que se transmite a través del objeto (o más propiamente, difractada por el objeto). Si tomamos un objeto y entramos a una habitación con una fuente de luz, y luego sostenemos el objeto entre la fuente de luz y nuestro ojo, podremos apreciar parte de la dificultad en tal iluminación; se requiere que el objeto examinado sea casi transparente, es decir, translúcido. Ahí radica otro aspecto del problema: los objetos “casi transparentes” pueden ser difíciles de ver.

Una de las mejores maneras de hacer que un espécimen fino y translúcido sea visible bajo el microscopio es teñirlo con un tinte que absorbe sólo ciertas longitudes de onda dentro del espectro visible. Las longitudes de onda que no se absorben se transmiten al ojo, lo cual hace que el objeto teñido aparezca coloreado. Diferentes tintes se unen a diferentes tipos de moléculas biológicas y, por tanto, estos procedimientos no sólo aumentan la visibilidad de la muestra, sino que también pueden indicar en qué parte de las células o tejidos se encuentran diferentes tipos de sustancias. Un buen ejemplo es la tinción de Feulgen, que es específica para el DNA, lo que favorece la aparición de cromosomas coloreados bajo el microscopio (**FIGURA 18-5**). Un problema con las tinciones es que generalmente no se pueden usar con las células vivas; por lo general son tóxicas, así como sus condiciones, o las tinciones no penetran en la membrana plasmática. La tinción de Feulgen, por ejemplo, requiere que el tejido se hidrolice en ácido antes de aplicar la tinción.



**FIGURA 18-5 La tinción de Feulgen.** Este procedimiento de tinción es específico para el DNA tal como lo indica la localización del tinte en los cromosomas de esta célula de la raíz de la cebolla que estaba en la metafase de la mitosis en el momento en que se fijó.

FUENTE: Ed Reschke.

## 18.2 Microscopía de campo brillante y de contraste de fase

Los diferentes tipos de microscopios ópticos utilizan diferentes tipos de iluminación. En un **microscopio de campo brillante**, el cono de luz que ilumina la muestra se ve como un fondo brillante contra el cual se debe contrastar la imagen de la muestra. La microscopía de campo brillante es ideal para muestras de alto contraste, como secciones teñidas de tejidos, pero puede no proporcionar una visibilidad óptima para otras muestras. En las siguientes secciones, consideraremos varios medios para hacer que las muestras sean más visibles en un microscopio óptico.

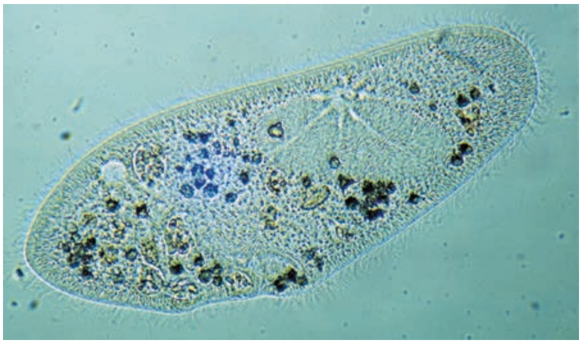
### Microscopio óptico de campo brillante

Las muestras que se observarán con el microscopio óptico se dividen ampliamente en dos categorías: fijaciones enteras y por secciones. Una **fijación entera** es un objeto intacto, vivo o muerto, que puede consistir en un organismo microscópico entero, como un protozoo o una pequeña parte de un organismo más grande. La mayoría de los tejidos de las plantas y los animales son demasiado opacos para el análisis microscópico a menos que se examinen como un corte o sección muy delgada. Para preparar una **sección**, primero se mueren las células sumergiendo el tejido en una solución química, llamada **fijador**. Un buen fijador penetra rápidamente en la membrana celular e inmoviliza todo su material macromolecular de modo que la estructura de la célula se mantenga lo más cerca posible del estado vivo. Los fijadores más comunes para el microscopio óptico son soluciones de formaldehído, alcohol o ácido acético.

Después de la fijación, el tejido se deshidrata por transferencia a través de una serie de alcoholes y, generalmente, luego se incorpora en la parafina (cera), que proporciona el soporte mecánico durante el corte. La parafina se utiliza como medio de inclusión porque se disuelve fácilmente con los disolventes orgánicos. Los portaobjetos que contienen las secciones de parafina adherentes se sumergen en tolueno, que disuelve la cera, dejando la porción delgada de tejido unida al portaobjetos, donde se puede teñir o tratar con los anticuerpos u otros agentes. Después de la tinción, se monta un cubreobjetos sobre el tejido utilizando un medio de montaje que tiene el mismo índice de refracción que el portaobjetos de vidrio y el cubreobjetos.

### Microscopio de contraste de fase

Las muestras pequeñas y no teñidas, como una célula viva, pueden ser muy difíciles de ver con un microscopio de campo brillante (**FIGURA 18-6*a***). El **microscopio de contraste de fase** hace que los objetos altamente transparentes sean más visibles (figura 18-6*b*). Podemos distinguir diferentes partes de un objeto porque afectan a la luz de manera diferente entre sí. Una base para tales diferencias es el índice de refracción. Los orgánulos celulares están formados por diferentes proporciones de varias moléculas: DNA, RNA, proteína, lípidos, carbohidratos, sales y agua. Las regiones de composición diferente probablemente tengan diferentes índices de refracción. Normalmente, tales diferencias no



*a*)



*b*)



*c*)

**FIGURA 18-6 Una comparación de las células vistas con diferentes tipos de microscopios ópticos.** Micrografías ópticas de un protista ciliado como se observa bajo la óptica de campo brillante *a*), contraste de fase *b*) y contraste de interferencia diferencial (DIC, *differential interference contrast) (o Nomarski)* *c*). El organismo es apenas visible bajo la iluminación del campo brillante, pero se ve claramente bajo contraste de fase y microscopía DIC.

FUENTE: (*a-c*) Micrografías de M. I. Walker/Photo Researchers, Inc.

pueden ser detectadas por nuestros ojos. Sin embargo, el microscopio de contraste de fase convierte las diferencias en el índice de refracción en diferencias de intensidad (brillo relativo y oscuridad), que son visibles para el ojo. Los microscopios de constraste de fase logran este resultado 1) separando la luz directa que ingresa al lente objetivo de la luz difractada, la cual emana de la muestra y 2) provoca que los rayos de luz de estas dos fuentes *interfieran* entre sí. El brillo relativo o la oscuridad de cada parte de la imagen refleja la forma en que la luz de esa parte de la muestra interfiere con la luz directa.

Los microscopios de contraste de fase son más útiles para examinar componentes intracelulares de células vivas a una resolución relativamente alta. Por ejemplo, la motilidad dinámica de las mitocondrias, los cromosomas mitóticos y las vacuolas se puede seguir y registrar con estas ópticas. Simplemente observar la forma en que las partículas diminutas y las vacuolas de las células se golpean de forma aleatoria en una célula viva transmite una excitación sobre la vida que es inalcanzable al observar las células muertas y teñidas. El mayor beneficio derivado de la invención del microscopio de constraste de fase no ha estado en el descubrimiento de nuevas estructuras, sino en su uso diario en los laboratorios de investigación y docencia para observar las células de una manera más reveladora.

El microscopio de contraste de fase tiene desventajas ópticas que resultan en la disminución de la resolución, y la imagen sufre de halos y sombreados que se producen cuando existen cambios bruscos en el índice de refracción. El microscopio de constraste de fase es un tipo de *microscopio de interferencia.* Otros tipos de microscopios de interferencia minimizan estos artefactos ópticos al lograr una separación completa de los haces directos y difractados utilizando caminos para la luz y prismas complejos. Otro tipo de sistema de interferencia, llamado *contraste de interferencia diferencial* (DIC, *differential interference contrast*), o a veces interferencia de Nomarski por su desarrollador, entrega una imagen que tiene una aparente calidad tridimensional (figura 18-6*c*). El contraste en la microscopía DIC depende de la tasa de cambio del índice de refracción en una muestra. Como consecuencia, los bordes de las estructuras, donde el índice de refracción varía en una distancia relativamente pequeña, se ven con un contraste especialmente bueno.

## 18.3 Microscopía de fluorescencia (y técnicas relacionadas basadas en la fluorescencia)

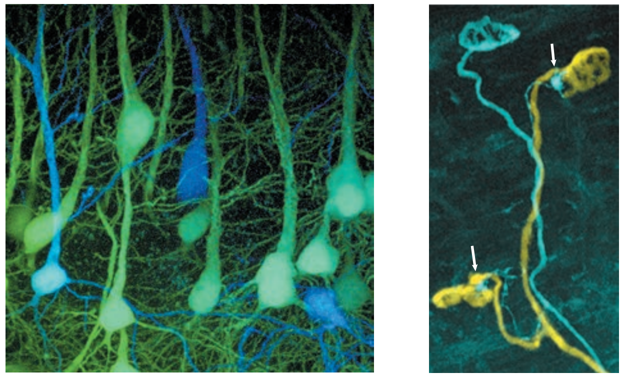
En las últimas décadas, el microscopio óptico se ha transformado de un instrumento diseñado principalmente para examinar secciones de tejidos fijos a uno capaz de observar los eventos dinámicos que ocurren a nivel molecular en las células vivas. Estos avances en la formación de imágenes de las células vivas han sido posibles, en gran medida, gracias a las innovaciones en la *microscopía de fluorescencia*. El microscopio de fluorescencia permite a los espectadores observar la ubicación de ciertas moléculas (llamadas fluoróforos). Los fluoróforos absorben fotones de una longitud de onda específica y liberan una parte de la energía en longitudes de ondas más largas, un fenómeno llamado *fluorescencia*. La fuente de luz en un microscopio de fluorescencia produce un haz de luz que viaja a través de un filtro, que bloquea todas las longitudes de onda, excepto aquellas capaces de excitar el fluoróforo. El haz de luz monocromática se enfoca en la muestra que contiene el fluoróforo, que se excita y emite luz de una longitud de onda visible enfocada por el lente objetivo en una imagen que puede ser vista por el espectador o capturada digitalmente usando un dispositivo de carga acoplada (CCD, *charge-coupled device*).

Hay muchas formas diferentes en que las moléculas fluorescentes pueden usarse en biología celular y molecular. En una de sus aplicaciones más comunes y antiguas, un fluoróforo orgánico relativamente pequeño (como la rodamina o la fluoresceína) se une de forma covalente (*conjugado*) a un anticuerpo para producir otro fluorescente que se puede usar para determinar la ubicación de una proteína específica dentro de la célula. Esta técnica se llama *inmunofluorescencia* y se ilustra mediante una micrografía en la figura 9.5. La inmunofluorescencia se analiza con más detalle en la sección 18.26. Las proteínas marcadas fluorescentemente también pueden usarse para estudiar procesos dinámicos tal como ocurren en una célula viva. Por ejemplo, un fluoróforo se puede unir a una proteína celular, como actina o tubulina, y la proteína marcada fluorescente se inyecta en una célula viva (como en la figura 9.20). Los fluoróforos también se pueden usar para localizar las moléculas de DNA o RNA que contienen secuencias de nucleótidos específicas como se ilustra en la figura 10.20. En otros ejemplos, los fluoróforos se han utilizado para estudiar los tama-

ños de las moléculas que pueden pasar entre las células (véase la figura 7.30), como indicadores del potencial transmembrana (véase la figura 5.21) o como sondas para determinar la concentración de $Ca^{2+}$ libre en el citosol (véase la figura 15.27). El uso de los fluoróforos sensibles al calcio se discute en la página 614.

En todos los ejemplos discutidos en el párrafo anterior, las biomoléculas se han vuelto fluorescentes al conjugarlas químicamente con un fluoróforo sintético. Pero también hay moléculas fluorescentes de forma natural. Los humanos probablemente se hayan preguntado por miles de años por qué las medusas y algunos otros organismos marinos brillan en la oscuridad. No fue hasta principios de la década de 1960 que Osamu Shimomura descubrió que cierta especie de medusa (*Aequorea victoria*) debe su carácter luminiscente a la presencia de proteínas fluorescentes, como la aequorina y la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), que fue capaz de purificar y analizar. A principios de la década de 1990, Douglas Prasher, Martin Chalfie y sus colegas clonaron el gen que codifica la GFP y mostraron que la proteína fluorescente podría incorporarse genéticamente y expresarse en otro organismo. Este estudio preparó el escenario para el uso de la GFP en el estudio de la distribución espacial y temporal de las proteínas en las células vivas. A diferencia de la mayoría de las otras proteínas fluorescentes, GFP no requiere un cofactor adicional para absorber y emitir la luz; en su lugar, el cromóforo absorbente emisor de la luz se forma por automodificación (es decir, mediante una reacción autocatalítica) de tres de los aminoácidos que componen la estructura primaria del polipéptido GFP. En la mayoría de los estudios que emplean GFP, se construye un DNA recombinante en el que la región codificante del gen GFP se une a la región codificante del gen para la proteína en estudio. Este DNA recombinante se usa para transfectar las células, que luego sintetizan una proteína quimérica que contiene la GFP fluorescente fusionada a la proteína en estudio. El uso de la GFP para estudiar el tránsito a través de la membrana se analiza en la sección 8.2. En estos diversos protocolos experimentales, las proteínas marcadas participan en las actividades normales de la célula, y su ubicación puede seguirse microscópicamente para revelar las actividades dinámicas en las que participa la proteína (véanse las figuras 8.4 y 9.22).

El estudio de la imagen de la célula viva a menudo puede ser más informativo mediante el uso simultáneo de variantes de GFP que exhiben diferentes propiedades espectrales. Las variantes de la GFP que fluorescen en tonos de azul (BFP, *blue FP*), amarillo (YFP, *yellow FP*) y cian (CFP, *cyan FP*) fueron generadas por Roger Tsien de la Universidad de California, San Diego, a través de la mutagénesis dirigida del gen *GFP*. Además, una proteína tetramérica fluorescente roja con una relación distante (DsRed) ha sido aislada de una anémona de mar. Las variantes monoméricas de DsRed (por ejemplo, mBanana, mTangerine y mOrange), que emiten fluorescencia en una variedad de colores distinguibles, también se han generado mediante experimentos de mutagénesis en el laboratorio de Tsien. El tipo de información que se puede obtener utilizando esta colorida "paleta" de variantes de GFP se ilustra mediante el estudio representado en la **FIGURA 18-7**, en el que los investigadores generaron cepas de ratones cuyas neuronas contenían proteínas fluorescentes de diferentes colores. Cuando un músculo de uno de estos ratones se expuso quirúrgicamente, los investigadores pudieron observar las interacciones dinámicas entre las neuronas de diversos colores y las uniones neuromusculares que están inervadas (consúltese la figura 4.56 para ver un dibujo de este tipo de unión). Observaron, por ejemplo, como ramas de una neurona coloreada con CFP compitieron con ramas de una neurona coloreada con YFP para el contacto sináptico con el tejido muscular. En cada caso, encontraron que, cuando dos neuronas compiten por la inervación de diferentes fibras musculares, todas las ramas "ganadoras" pertenecen a una de las neuronas, mientras que todas las ramas "perdedoras" pertenecen a la otra neurona (figura 18-7*b*). Las micrografías en la



*a*) *b*)

**FIGURA 18-7 Uso de variantes de GFP para seguir las interacciones dinámicas entre las neuronas y sus células blanco *in vivo*.** *a*) Una porción del cerebro de un ratón con dos neuronas fluorescentes de colores diferentes. Estos ratones se generan al aparearse animales transgénicos cuyas neuronas están marcadas con una u otra proteína fluorescente. *b*) Microfotografía de fluorescencia de partes de dos neuronas, una etiquetada con YFP y la otra con CFP. Las flechas indican dos uniones neuromusculares diferentes en dos fibras musculares diferentes en las que la rama axonal marcada con YFP ha superado a la rama marcada con CFP. La tercera unión está inervada por el axón marcado con CFP en ausencia de competencia.

FUENTE: *a*) Cortesía de N. Kasthuri y J. W. Lichtman, Facultad de Medicina de la Universidad de Washington; *b*) De N. Kasthuri y Jeff W. Lichtman, Nature 424: 429, 2003, Fig. 4A. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

**FIGURA 18-8** proporcionan otro ejemplo de cuánto se puede aprender sobre la dinámica espacial y temporal de los eventos celulares usando dos (o más) proteínas fluorescentes espectralmente distintas. En este caso, la estrategia de marca dual ha permitido a los investigadores seguir los movimientos simultáneos de dos proteínas diferentes en tiempo real a medida que ocurren dentro de los límites de un solo orgánulo celular. Otro ejemplo se describe en las vías experimentales en la sección 8.18.

Las variantes de GFP también han sido útiles en una técnica, llamada *transferencia de energía de resonancia de fluorescencia* (o Förster) (FRET, *fluorescence (or Förster) resonance energy transfer*), que puede medir las distancias entre los fluoróforos en el rango de la nanoescala. Por lo general, la FRET se emplea para medir los cambios en la distancia entre dos partes de una proteína (o entre dos proteínas separadas dentro de una estructura más grande). La FRET puede usarse para estudiar dichos cambios a medida que ocurren *in vitro* o dentro de una célula viva. La FRET se basa en el hecho de que la energía de excitación se puede transferir de un grupo fluorescente (un donante) a otro grupo fluorescente (un aceptor), siempre que los dos grupos estén muy cerca (de 1 a 10 nm). Esta transferencia de energía reduce la intensidad de la fluorescencia del donante y aumenta la intensidad de la fluorescencia del aceptor. La eficiencia de la transferencia entre dos grupos fluorescentes que se unen en sitios estratégicos en una proteína disminuye de forma brusca a medida que aumenta la distancia entre los dos grupos. Como resultado, la determinación de los cambios en la fluorescencia de los grupos donadores y aceptores que se produce durante un proceso celular proporciona una medida de los cambios en la distancia entre ellos en diversas etapas del proceso. Esta técnica se ilustra en la **FIGURA 18-9**, donde dos variantes diferentes de GFP (marcadas como ECFP y EYFP) se han unido covalentemente a dos partes diferentes de una proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG, *cGMP-dependent protein kinase*). En ausencia del cGMP unido, los dos fluoróforos están demasiado separados para que se produzca la transferencia de energía. La unión del cGMP induce un cambio conformacional en la proteína que lleva a los dos fluoróforos lo suficientemente cerca para que

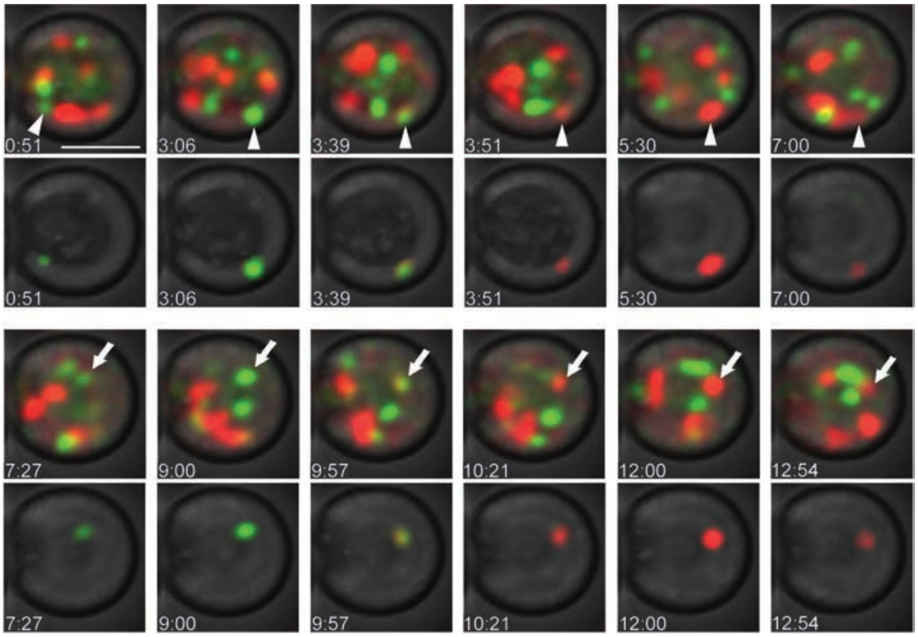



**FIGURA 18-8 Uso de la fluorescencia de doble marcador para seguir los eventos dinámicos dentro de los orgánulos de las células vivas.** Las cisternas de Golgi de una célula de levadura en ciernes no están organizadas en pilas distintas como en la mayoría de las células eucariotas, sino que están dispersas dentro del citoplasma. Cada una de las estructuras ovales de colores brillantes es una cisterna individual cuyo color se debe a la localización de las moléculas proteicas marcadas fluorescentemente. Una cisterna que parece verde contiene una proteína marcada con GFP (Vrg4) involucrada en las primeras actividades de Golgi, mientras que una cisterna que parece roja contiene una proteína marcada con DsRed (Sec7) involucrada en las actividades tardías de Golgi. Esta serie de micrografías revela la composición proteica de las cisternas individuales durante un periodo de aproximadamente 13 minutos (el tiempo transcurrido se indica en la esquina inferior izquierda). La punta de flecha blanca y la flecha blanca señalan dos de estas cisternas a lo largo del tiempo. Estas dos cisternas se muestran por sí mismas en las filas inferiores de las micrografías. Se puede observar a partir de esta serie que la composición proteica de una cisterna individual cambia con el tiempo de una que contiene proteínas "tempranas" de Golgi (verde) a una que contiene proteínas "tardías" de Golgi (roja). Estos hallazgos proporcionan soporte visual directo para el modelo de maduración cisternal discutido en la sección 8.8.

FUENTE: De Eugene Losev *et al*., Cortesía de Benjamin S. Glick, Nature 441: 1004, 2006, Fig. 3A. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

ocurra la FRET, que también se puede usar para seguir muchos otros procesos, incluido el plegamiento de las proteínas o la asociación y disociación de los componentes dentro de una membrana. La separación de las colas citoplásmicas de las subunidades de integrina después de la activación por talina (figura 7.13) es un ejemplo de un evento que ha sido estudiado por la FRET. La figura 15.8 muestra un ejemplo inicial en el que se utilizó FRET para revelar los cambios en los niveles de cAMP después de la unión de un neurotransmisor con su receptor de superficie.

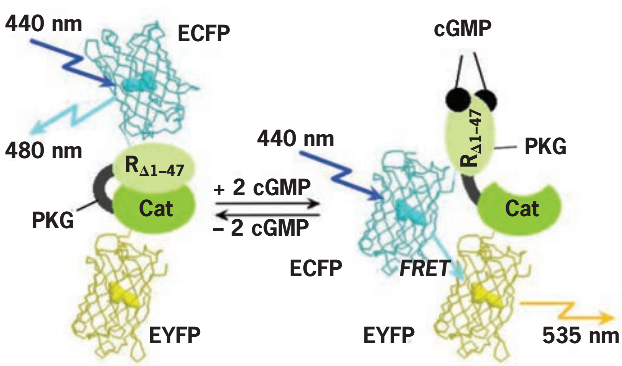


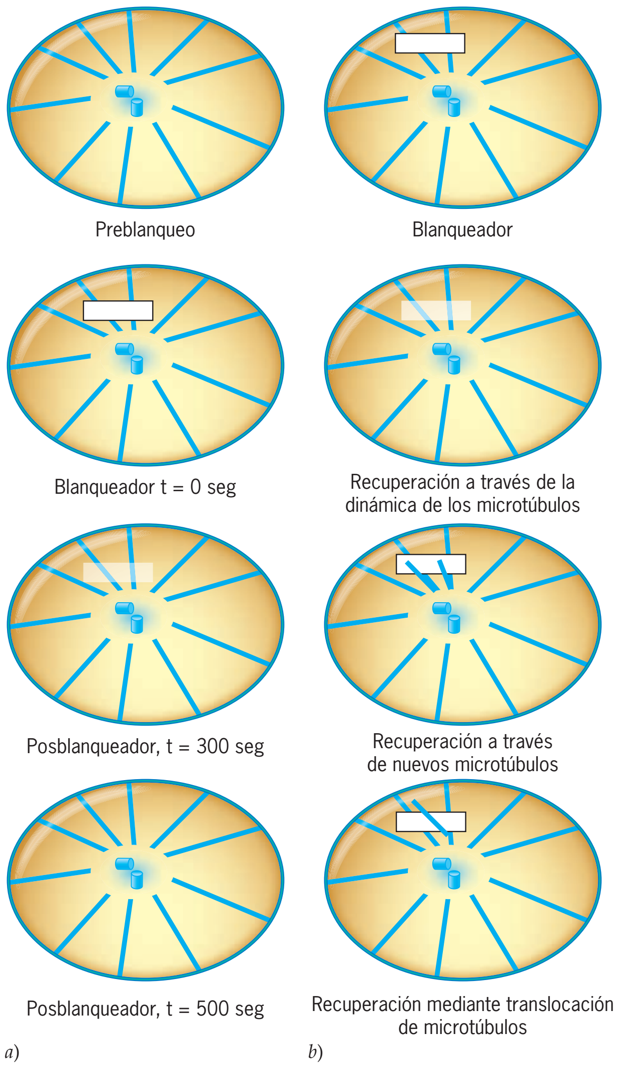

**FIGURA 18-9 Transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*).** Este diagrama esquemático muestra un ejemplo del uso de la tecnología FRET para seguir el cambio en la conformación de una proteína (PKG) después de la unión a cGMP. Las dos pequeñas proteínas fluorescentes en forma de barril, CFP mejorado (ECFP, *enhanced CFP*) y YFP mejorado (EYFP, *enhanced YFP*), se muestran en su color fluorescente. En ausencia de cGMP, la excitación de ECFP con luz de 440 nm conduce a la emisión de luz de 480 nm de la proteína fluorescente. Después de la unión a cGMP, un cambio conformacional en PKG pone a las dos proteínas fluorescentes lo suficientemente cerca para que ocurra la FRET. Como resultado, la excitación del donante de ECFP con luz de 440 nm conduce a la transferencia de energía al aceptador de EYFP y a la emisión de luz de 535 nm del aceptador. Las versiones mejoradas de estas proteínas tienen una mayor intensidad de fluorescencia y tienden a ser más estables que las moléculas de proteína originales.

FUENTE: De Moritoshi Sato y Yoshio Umezawa, Analytical Chemistry 72: 5924, 2000. © 2000 American Chemical Society.

Después de un periodo de excitación por una fuente de luz, la mayoría de los fluoróforos alcanzan un estado en el que ya no pueden emitir fluorescencia, esto es, que ellos experimentan un fotoblanqueo. Si bien en ocasiones esto se considera una desventaja para muchos experimentos, el fotoblanqueo ha demostrado ser útil para una técnica conocida como recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*). FRAP se utiliza para estudiar la tasa de recambio proteico en las células vivas, y fue analizada junto con el movimiento de las proteínas de la membrana (figura 4.27). FRAP también se ha utilizado ampliamente para estudiar el recambio de la proteína en el citoesqueleto. Para llevar a cabo un experimento FRAP centrado en la tubulina, una célula se inyecta con tubulina acoplada a un colorante fluorescente o se induce para que exprese GFP-tubulina. Usando un microscopio equipado con un láser que se puede enfocar en una pequeña región de la célula, la fluorescencia de la tubulina en esa región se blanquea con el rayo láser (**FIGURA 18-10**). Luego es posible seguir la muestra a lo largo del tiempo y medir la recuperación de la señal fluorescente en la zona decolorada (figura 18-10).

Otra innovación en la microscopía de fluorescencia ha sido el desarrollo de software que se puede utilizar para examinar grandes cantidades de imágenes y calificarlas para diversas características. Estas tecnologías automatizadas han sido particularmente útiles para el estudio de los fenotipos de células que han sido sometidas a una biblioteca de diferentes siRNA, buscando genes que codifiquen las proteínas que están involucradas en un proceso celular particular, como el transporte a través de las membranas (sección 8.2) o la mitosis (figura 18-51). Además, el software también se ha desarrollado para rastrear el movimiento de las proteínas fluorescentes en las células vivas identificando y "siguiendo" de forma automática una mancha fluorescente específica que aparece en numerosas estructuras en las series de tiempo.

Otra innovación reciente en la microscopía de fluorescencia cae bajo el título de microscopía multifotónica, en la que los fluoróforos presentes en las células se excitan mediante la absorción simultánea de dos o más fotones de longitud de onda más larga. Cuanto más larga sea la longitud de onda del fotón, menos su energía (que hace que sea menos destructivo para las células iluminadas y para el fluoróforo absorbente) y mayor es su poder de penetración. Usando la microscopía multifotónica, los investiga-



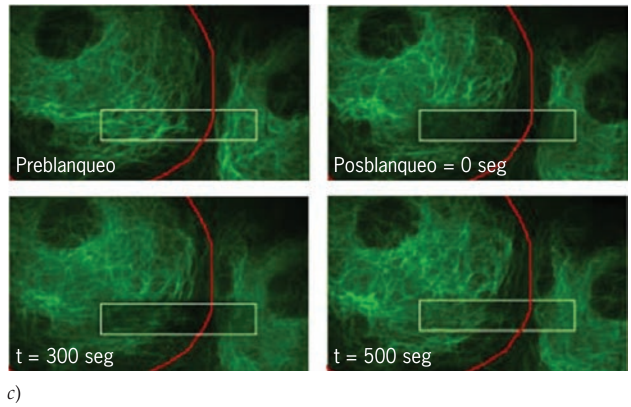




**FIGURA 18-10 El estudio del citoesqueleto usando FRAP.** *a*) Una célula que expresa GFP-tubulina incorpora la tubulina fluorescente en su matriz de microtúbulos. Cuando un láser se enfoca en un cuadro de la matriz, la fluorescencia se blanquea (t = 0 seg). Con el tiempo, la fluorescencia se recupera en la zona decolorada. *b*) La recuperación de la fluorescencia puede provenir de diferentes propiedades de los microtúbulos. Es muy probable que las propiedades dinámicas de los microtúbulos contribuyan a la recuperación de la fluorescencia. Alternativamente, si los nuevos microtúbulos fluorescentes crecen desde el centrosoma, pueden crecer hacia la zona decolorada. Finalmente, es posible que un microtúbulo de translocación fluorescente pueda moverse a través de la zona decolorada y verse allí en el momento de la observación. *c*) Micrografías de un experimento FRAP realizado en células interfásicas (que no se dividen) que expresan GFP-tubulina. Dos células de lado a lado se blanquearon en la región en cuadro con un láser, y se obtuvieron imágenes de las células a lo largo del tiempo. La señal de la fluorescencia en la región blanqueada se recupera durante el transcurso del experimento.

FUENTE: Cortesía de Claire Walczaw y Rania Rizk.

dores pueden rastrear los movimientos de las proteínas fluorescentes que están presentes al menos a 200 μm de profundidad dentro de un tejido vivo. Un ejemplo del uso de este enfoque se puede ver en la figura 17.11, donde se observan las células inmunes marcadas con fluorescencia a medida que se mueven dentro de un ganglio linfático extirpado.

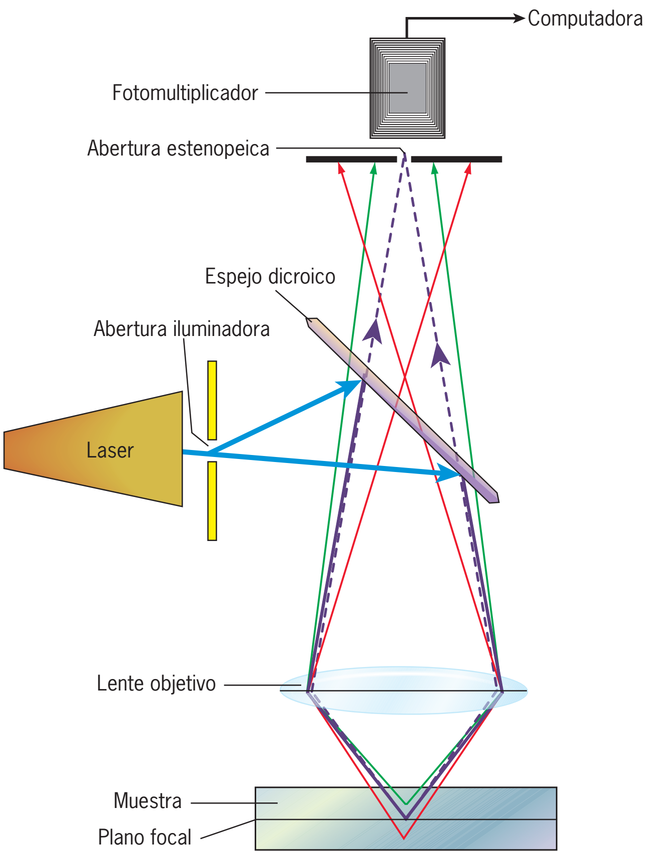
## Microscopía confocal de escaneo láser

El uso de las cámaras digitales y el procesamiento de las imágenes en las computadoras ha llevado a un renacimiento del microscopio óptico en las últimas dos décadas. También lo ha hecho el desarrollo de un nuevo tipo de microscopio óptico. Cuando una célula completa o una sección de un órgano se examina con un microscopio óptico estándar, se observa la muestra a diferentes profundidades al cambiar la posición del lente objetivo girando la perilla de enfoque. Cuando se hace esto, diferentes partes de la muestra entran y salen del foco. Pero el hecho de que la muestra contenga diferentes niveles de enfoque reduce la capacidad de formar una imagen nítida, porque esas partes de la muestra que están encima y debajo del plano de enfoque interfieren con los rayos de luz de esa parte que se encuentra en el plano del enfoque. A finales de la década de 1950, Marvin Minsky, del Instituto de Tecnología de Massachusetts, inventó un nuevo instrumento revolucionario llamado **microscopio confocal** que produce una imagen de un plano delgado situado dentro de un espécimen mucho más grueso. En la **FIGURA 18-11*a*)** se muestra un diagrama esquemático de los componentes ópticos y las trayectorias de la luz dentro de una versión moderna de un *microscopio confocal* de *barrido láser*. En este tipo de microscopio, la muestra se ilumina con un rayo láser finamente enfocado que escanea rápidamente a través de esta y a una profundidad única, iluminando sólo un plano delgado (o "sección óptica") dentro de la misma. Como se indica en la figura 18-11*a*), se usan microscopios confocales con óptica de fluorescencia. Como se describió anteriormente, la luz incidente de onda corta es absorbida por los fluoróforos en una muestra y reemitida a una longitud de onda más larga. La luz emitida por la muestra se enfoca en un sitio dentro del microscopio que contiene una abertura estenopeica. Por tanto, la apertura y el plano iluminado en la muestra son confocales. Los rayos de luz emitidos desde el plano iluminado de la muestra pueden pasar a través de la abertura, mientras que cualquier luz que pueda emanar desde arriba o desde abajo de este plano no puede participar en la formación de la imagen. Como resultado, puntos fuera del foco en la muestra se vuelven invisibles.

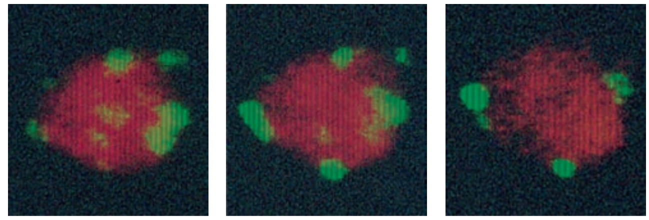
La figura 18-11*b*) contiene las micrografías de un núcleo de célula única tomada en tres planos diferentes dentro de la muestra. Es evidente que los objetos que salen del plano de enfoque tienen poco efecto sobre la calidad de la imagen de cada sección. Si lo desea, las imágenes de secciones ópticas separadas se pueden almacenar en una computadora y fusionarse entre sí para reconstruir un modelo tridimensional del objeto completo.

## Microscopía de fluorescencia de súper resolución

En 2014, Eric Betzig, W.E. Moerner y Stefan Hell recibieron el Premio Nobel de Química por el desarrollo de la microscopía de




*a*)



*b*)

**FIGURA 18-11 Microscopía de fluorescencia confocal de barrido láser.** *a*) Las trayectorias de luz en un microscopio de fluorescencia confocal. La luz de la longitud de onda corta (azul) es emitida por una fuente de láser, pasa a través de una pequeña abertura y se refleja en un espejo dicroico (un tipo de espejo que refleja ciertas longitudes de onda y transmite a otros) en un objetivo y se enfoca en un punto del plano de la muestra. Los fluoróforos en la muestra absorben la luz incidente y emiten luz de mayor longitud de onda, que puede pasar a través del espejo dicroico y enfocarse en un plano que contiene una abertura estenopeica. La luz luego pasa a un tubo fotomultiplicador que amplifica la señal y se transmite a una computadora que forma una imagen procesada y digitalizada. Se evita que los rayos de luz que se emitan desde arriba o debajo del plano óptico en la muestra pasen a través de la abertura estenopeica y, por tanto, no contribuyen a la formación de la imagen. Este diagrama muestra la iluminación de una sola mancha en la muestra. Diferentes sitios dentro de este plano se iluminan por medio de un proceso de escaneo láser. El diámetro de la abertura estenopeica es ajustable. Cuanto menor es la apertura, más delgada es la sección óptica y mayor es la resolución, pero la señal es menos intensa. *b*) Micrografías de fluorescencia confocal de tres secciones ópticas separadas, cada una de 0.3 μm de espesor, de un núcleo de levadura teñido con dos anticuerpos diferentes marcados fluorescentemente. El anticuerpo fluorescente rojo ha teñido el DNA dentro del núcleo, y el anticuerpo fluorescente verde ha teñido una proteína de unión de los telómeros que se localiza en la periferia del núcleo.

FUENTE: *a*, *b*) De Thierry Laroche y Susan M. Gasser, Cell 75: 543, 1993, Cell by Cell Press. Reproducido con permiso de Cell Press en el formato de reutilización en un libro/libro de texto a través de Copyright Clearance Center y con el permiso de Elsevier.

fluorescencia de súper resolución. Se señaló en la sección 18.1 que el límite de resolución del microscopio óptico es de aproximadamente 200 nm debido a las propiedades de difracción de la luz. Durante la última década, se han desarrollado varias técnicas ópticas complejas que permiten a los investigadores localizar las proteínas marcadas fluorescentemente a resoluciones en las decenas de nanómetros. Varias de estas técnicas de súper resolución se basan en el descubrimiento de que una cierta mutación del polipéptido GFP convierte la proteína en una molécula fotoactivable (PA-GFP, *photoactivatable-GFP*). Esta GFP mutante permanece esencialmente no fluorescente hasta que se activa con luz violeta. Estudios posteriores han ampliado el número de proteínas fluorescentes fotoactivables disponibles y han llegado al desarrollo de proteínas fotoconmutables, cuya emisión de fluorescencia a una longitud de onda particular puede encenderse y apagarse con pulsos de luz. Consideraremos brevemente sólo una de las técnicas de súper resolución, llamada STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*: microscopía de reconstrucción óptica estocástica), que utiliza proteínas fluorescentes fotoconmutables. STORM permite a los investigadores localizar una sola molécula fluorescente dentro de una resolución de menos de 20 nm. En esta técnica, una muestra que contiene uno o más fluoróforos fotoconmutables se ilumina con pulsos de luz de longitudes de onda apropiadas, lo que tiene el efecto de activar y desactivar la fluorescencia de las moléculas marcadas. Durante cada ciclo de iluminación, la mayoría de las moléculas marcadas permanecen oscuras, pero una pequeña fracción de ellas se activan al azar. Estas moléculas fluorescentes activadas individuales aparecen como manchas que, debido a las propiedades de difracción de la luz, tienen varios cientos de nanómetros de ancho. El centro de cada punto, que representa la ubicación real del único fluoróforo responsable de emitir la luz, se puede determinar con gran precisión. Este proceso se repite para varios ciclos de imágenes, produciendo una gran cantidad de coordenadas que representan las ubicaciones de muchos de los fluoróforos en la muestra. El análisis de estas coordenadas permite a los investigadores reconstruir una imagen de súper resolución del campo de visión. El marcado aumento en la resolución que se puede lograr con la técnica de súper resolución STORM frente a la de una técnica de fluorescencia convencional es evidente comparando la imagen de la **FIGURA 18-12*a*)** con las de las figuras 18-12*b* y *c*).

## Microscopía de fluorescencia mediante hoja de luz

En los últimos años, la microscopía de fluorescencia mediante hoja de luz ha ganado popularidad como una técnica que permite la obtención de imágenes no invasivas de muestras tridimensionales grandes, a menudo de embriones enteros u organismos como el pez cebra, durante largos periodos. En este método, un láser de excitación se enfoca en una lámina delgada y plana que ilumina la muestra a lo largo de un plano perpendicular al ángulo de observación. Esto permite la excitación de los fluoróforos sólo a la profundidad observada sobre un plano completo (en lugar de sólo en un punto, como en imágenes confocales), dando como resultado una disminución del fotodaño y una mayor velocidad de adquisición de las imágenes.

En 2014, Eric Betzig y otros anunciaron una nueva técnica, llamada microscopía de hoja de luz de celosía, que ilumina las muestras utilizando múltiples hojas de luz ultrafinas, que permi-

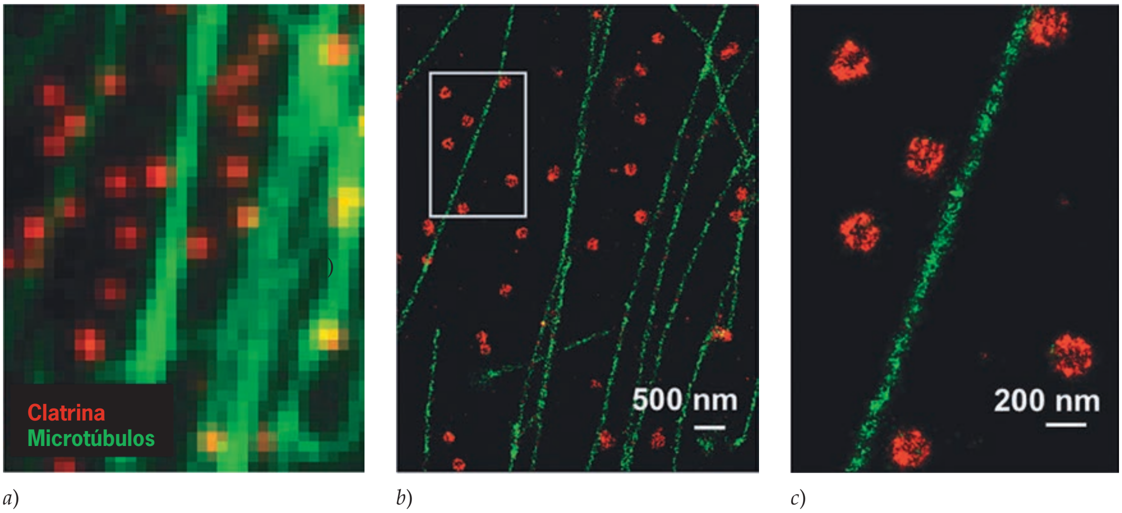



**FIGURA 18-12 Rompiendo el límite de resolución del microscopio de luz.** *a*) Una micrografía de fluorescencia convencional de una porción de una célula de mamífero cultivada con microtúbulos marcados en las fosas recubiertas con clatrina verde y en rojo. Con este alto nivel de ampliación, la imagen aparece pixelada. Además, la superposición entre las dos marcas fluorescentes produce un color naranja, lo que sugiere que las dos estructuras están interconectadas. *b*) Una micrografía de STORM de "súper resolución" de un campo similar que muestra los microtúbulos y las fosas recubiertas de clatrina claramente resueltas y separadas espacialmente entre sí. (*c*) Una vista ampliada de una porción de la parte b. (La discusión de esta y otras técnicas de súper resolución se pueden encontrar en Nature 459: 638, 2009; Ann. Rev. Biochem. 78: 993, 2009; Cell 143: 1047, 2010; J. Cell Biol. 190: 165, 2010; y J. Cell Sci. 124: 1607, 2011).

FUENTE: De Mark Bates *et. al*., Cortesía de Xiaowei Zhuang, Science 317:1752, 2007; © 2007. Reproducido con permiso de AAAS.

ten la generación de imágenes en 3D de una muestra biológica viva durante largos periodos con una alta resolución espacio temporal con un mínimo de fotoblanqueo y fotodaño (**FIGURA 18-13**). Por ejemplo, esta técnica permite a los investigadores visualizar la localización subcelular de una proteína de interés en un embrión de mosca o de gusano en intervalos de subsegundos. La capacidad de recopilar imágenes de alta resolución en 4D (tres dimensiones y el tiempo) ya ha dado lugar a numerosas observaciones novedosas en una variedad de sistemas. Con un desarrollo continuo y un uso más generalizado, se anticipa ampliamente que la microscopía de hoja de luz de celosía proporcionará numerosos conocimientos sobre cómo los procesos moleculares dinámicos ocurren en las células vivas.



**FIGURA 18-13** Células vivas de tipo neutrófilo obtenidas mediante microscopía de hoja de luz de celosía y representadas digitalmente.

FUENTE: Cortesía de Lillian Fritz-Laylin, Thomas Goddard, Graham Johnson y R. Dyche Mullins, UCSF.

## 18.4 Microscopía electrónica de transmisión

Las micrografías electrónicas que se muestran en este texto fueron tomadas por dos tipos diferentes de microscopios electrónicos. Los *microscopios electrónicos de transmisión* (TEMs, *transmission electron microscopes*) forman imágenes que usan electrones que se transmiten a través de una muestra, mientras que los *microscopios electrónicos de barrido* (SEMs, *scanning electron microscopes*) utilizan electrones que rebotan en la superficie de la muestra. Todos los comentarios en esta sección del capítulo se refieren al uso del TEM; el SEM se discute por separado en la sección 18.6.

El microscopio electrónico de transmisión puede proporcionar una resolución mucho mayor que el microscopio de luz. Esto se ilustra fácilmente comparando las dos fotos en la **FIGURA 18-14**, que muestran las imágenes de las secciones adyacentes del mismo tejido con el mismo aumento usando una luz o un microscopio electrónico. Aunque la foto en la figura 18-14*a*) está cerca del límite de resolución del microscopio de luz, la foto en la figura 18-14*b*) es una micrografía electrónica de muy baja potencia. El gran poder de resolución del microscopio electrónico deriva de las propiedades de onda de los electrones. Como se indica en la ecuación de la sección 18.1, el límite de resolución de un microscopio es directamente proporcional a la longitud de onda de la luz iluminadora: cuanto más larga es la longitud de onda, más pobre es la resolución. A diferencia de un fotón de luz, que tiene una longitud de onda constante, la longitud de onda de un electrón varía con la velocidad a la que viaja la partícula, que a su vez depende de la tensión de aceleración aplicada en el microscopio. Esta relación está definida por la ecuación

$$\lambda = \sqrt{150/V}$$

donde $\lambda$ es la longitud de onda en angstroms y $V$ es el voltaje de aceleración en voltios. Los TEM estándar operan con un rango de voltaje de 10 000 a 100 000 V. A 60 000 V, la longitud de onda de un electrón es de aproximadamente 0.05 Å. Si esta longitud de onda y la apertura numérica alcanzable con el microscopio óptico

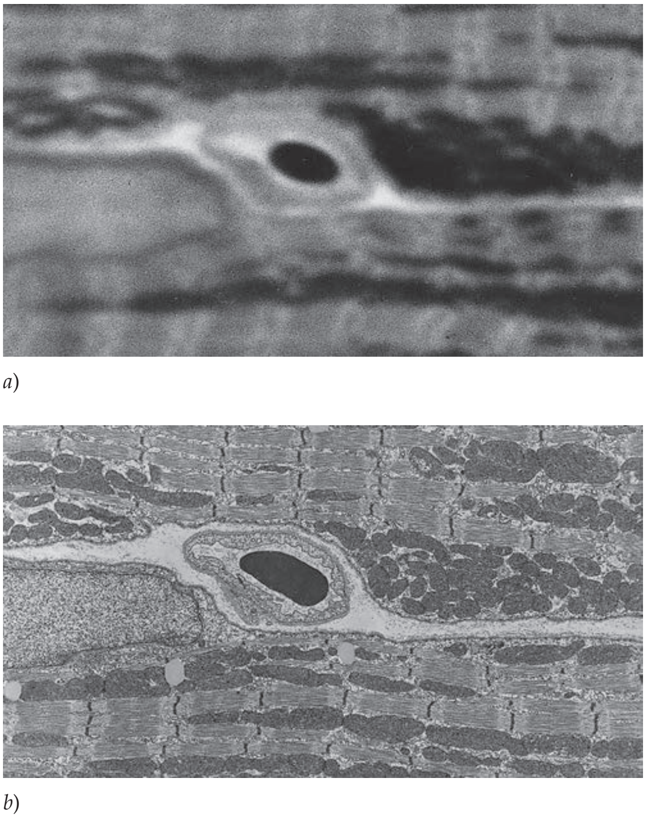



**FIGURA 18-14 Una comparación entre la información contenida en las imágenes tomadas por un microscopio óptico y electrónico con un aumento comparable de 4 500 veces el tamaño real.** *a*) Una fotografía del tejido muscular esquelético que se había incrustado en el plástico, se seccionó a 1 µm, y se fotografió con un microscopio de luz bajo un lente objetivo de inmersión en aceite. *b*) Una sección adyacente a la utilizada para la parte que se cortó a 0.025 µm y se examinó bajo el microscopio electrónico con un aumento comparable al de *a*. La imagen resultante muestra un aumento de resolución de 100 a 200 veces. Note la diferencia en los detalles de las miofibrillas musculares, las mitocondrias y el capilar que contiene un glóbulo rojo. Mientras que el microscopio óptico no puede proporcionar ninguna información adicional a la de *a*, el microscopio electrónico puede proporcionar mucha más información, produciendo imágenes, por ejemplo, de la estructura de las membranas individuales dentro de una pequeña porción de una de las mitocondrias (como en la figura 5.22).

FUENTE: *a*) y *b*) Cortesía de Douglas E. Kelly y M. A. Cahill.

fueran sustituidos en la ecuación en la página 701, el límite de resolución sería de aproximadamente 0.03 Å. De hecho, la resolución alcanzable con un microscopio electrónico de transmisión estándar es aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que su límite teórico. Esto se debe a la grave aberración esférica de las lentes de enfoque de electrones, que requiere que la apertura numérica de la lente sea muy pequeña (generalmente entre 0.01 y 0.001). El límite práctico de resolución del TEM estándar está en el rango de 3 a 5 Å. El límite real al observar la estructura celular es más típicamente en el rango de 10 a 15 Å.

Los microscopios electrónicos consisten principalmente en una columna cilíndrica alta y hueca a través de la cual pasa el haz de electrones y una consola que contiene un panel de cuadrantes que controlan electrónicamente la operación en la columna. La parte superior de la columna contiene el cátodo, un filamento de alambre de tungsteno que se calienta para proporcionar una fuente de electrones. Los electrones se extraen del filamento caliente y se aceleran como un haz fino por el alto voltaje aplicado entre el cátodo y el ánodo. El aire se bombea fuera de la columna antes de la operación, produciendo un vacío a través del cual viajan los electrones. Si no se eliminara el aire, los electrones se dispersarían prematuramente por la colisión con las moléculas del gas.

Al igual que un haz de rayos de luz puede ser enfocado por una lente de vidrio esmerilado, un haz de electrones cargados negativamente puede ser enfocado por lentes electromagnéticas, que están ubicadas en la pared de la columna. La intensidad de los imanes está controlada por la corriente que se les proporciona, que está determinada por las posiciones de los distintos diales de la consola. En la **FIGURA 18-15** se muestra una comparación de los sistemas de lentes de un microscopio óptico y electrónico. Las lentes del condensador de un microscopio electrónico se colocan entre la fuente de electrones y la muestra, y enfocan el haz de electrones en la muestra. Esta se apoya en una rejilla metálica delgada y pequeña (3 mm de diámetro) que se inserta con unas pinzas en el soporte de la rejilla, la cual, a su vez, se introduce en la columna del microscopio.

Debido a que las distancias focales de las lentes de un microscopio electrónico varían dependiendo de la corriente suministrada a ellas, una lente objetiva proporciona el rango completo de ampliación que proporciona el instrumento. Al igual que en el microscopio óptico, la imagen del lente objetivo sirve como objeto para un sistema de lente adicional. La imagen proporcionada por el lente objetivo de un microscopio electrónico sólo se magnifica unas 100 veces, pero a diferencia del microscopio óptico, hay suficiente detalle presente en esta imagen para ampliarla 10 000 veces más. Al alterar la corriente aplicada a las diferentes lentes del microscopio, los aumentos pueden variar de aproximadamente 1 000 veces a 250 000 veces. Los electrones que han pasado a través de la muestra se enfocan en una pantalla fosforescente situada en la parte inferior de la columna. Los electrones que golpean la pantalla excitan una capa de cristales fluorescentes, que emiten su propia luz visible, la cual es percibida por el ojo como una imagen de la muestra.

La formación de las imágenes en el microscopio electrónico depende de la dispersión diferencial de los electrones por parte

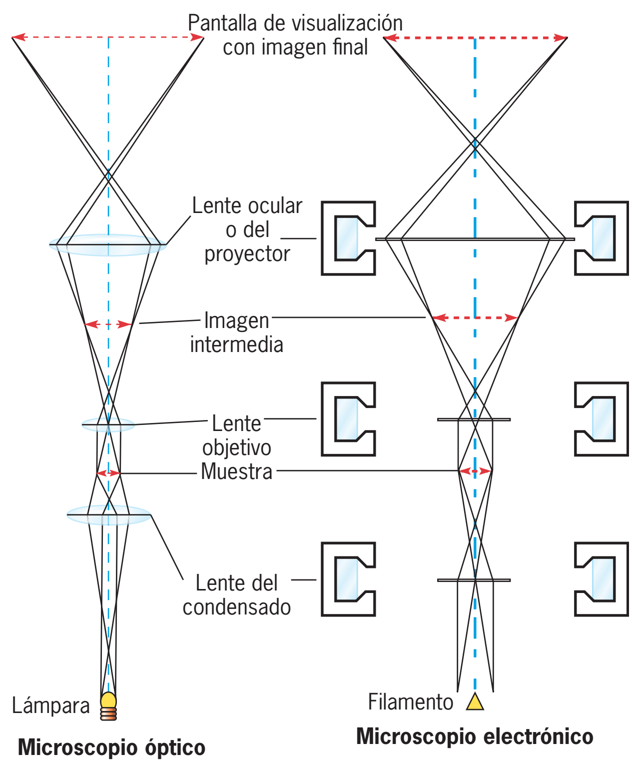



**FIGURA 18-15 Una comparación de los sistemas de lentes de un microscopio óptico y un microscopio electrónico.**

FUENTE: Reimpreso desde Alan W. Agar, *Principles and Practice of Electron Microscope Operation*, Elsevier/North-Holland, 1974. Usado con permiso de Elsevier Ltd.

de la muestra. Considérese un haz de electrones emitido por el filamento y enfocado en la pantalla. Si no hubiera ninguna muestra presente en la columna, la pantalla estaría iluminada de manera uniforme por el haz de electrones, produciendo una imagen uniformemente brillante. Por el contrario, si una muestra se coloca en la trayectoria del haz, algunos de los electrones chocan con los átomos de la muestra y se dispersan. Los electrones que rebotan en la muestra no pueden pasar a través de la pequeña abertura en el plano focal posterior del lente objetivo y, por tanto, se pierden como participantes en la formación de la imagen.

La dispersión de los electrones por parte de la muestra es proporcional al tamaño de los núcleos de los átomos que la forman. Debido a que el material insoluble de las células consiste en átomos con un número atómico relativamente bajo —carbón, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno— el material biológico posee muy poca capacidad intrínseca para dispersar los electrones. Para aumentar la dispersión de los electrones y obtener el contraste requerido, los tejidos se fijan y se tiñen con soluciones de metales pesados (que se describen a continuación). Estos metales penetran en la estructura de las células y se complejizan de modo selectivo con diferentes partes de los orgánulos. Las partes de una célula que se unen al mayor número de átomos metálicos permiten el paso del menor número de electrones. Cuantos menos electrones se enfoquen en la pantalla en un punto determinado, más oscuro será ese punto. Las fotografías de la imagen se hacen levantando la pantalla de visualización y permitiendo que los electrones golpeen una placa fotográfica en posición debajo de la pantalla. Debido a que las emulsiones fotográficas son directamente sensibles a los electrones, tanto como lo son a la luz, una imagen de la muestra se puede grabar directamente en la película. En los últimos años, la película ha sido reemplazada en gran parte por las técnicas de la imagen digital. La mayoría de los TEM modernos utilizan la detección de electrones indirectos, los cuales se convierten en fotones que luego pueden ser detectados por un sensor CCD, creando una imagen digital.

## 18.5 Preparación de las muestras para microscopía electrónica

Al igual que con el microscopio óptico, los tejidos a examinar en el microscopio electrónico deben fijarse, incrustarse y seccionarse. La fijación del tejido para microscopía electrónica (**FIGURA 18-16**) es mucho más crítica que para la microscopía óptica porque las secciones están sujetas a un escrutinio mucho mayor. Un fijador debe detener la vida de la célula sin alterar demasiado la estructura de esta. A nivel de la resolución del microscopio electrónico, el daño relativamente menor, como la inflamación de la mitocondria o la rotura del retículo endoplásmico, se vuelve muy evidente. Para obtener la fijación más rápida y el menor daño celular, se fijan y se incrustan trozos muy pequeños de tejido (menos de 1.0 $mm^3$). Los fijadores son sustancias químicas que desnaturalizan y precipitan las macromoléculas celulares. Los productos químicos que tienen tal acción pueden causar la coagulación o precipitación de los materiales que no se encontraban dentro de las estructuras en la célula viva, lo que lleva a la formación de un **artefacto**. El mejor argumento de que una estructura particular no es un artefacto es la demostración de su existencia en las células fijadas de una variedad de formas diferentes o, mejor aún, no fijadas en absoluto. Para ver las células que no se han fijado, el tejido se congela rápidamente y se utilizan técnicas especiales para revelar su estructura (véase criofijación y replicación de fractura por congelación, descritas más adelante). Los fijadores más comunes para la microscopía electrónica son el glutaraldehído y el tetróxido de osmio. El glutaraldehído es un compuesto de carbono con un grupo aldehído en cada extremo de la molécula. Los grupos aldehído reaccionan con los grupos amino en las proteínas y reticulan las proteínas en una red insoluble. El osmio es un metal pesado que reacciona principalmente con los ácidos grasos que conducen a la preservación de las membranas celulares.

Una vez que el tejido se ha fijado, el agua se elimina por deshidratación en alcohol, y los espacios de los tejidos se llenan con un material que sostienen el tejido seccionado. Las exigencias de la microscopía electrónica requieren que las secciones sean muy delgadas. Las secciones de cera cortadas para la microscopía óptica rara vez son más delgadas que aproximadamente 5 µm, mientras que las secciones para microscopía electrónica convencional son mejores cuando se cortan a menos de 0.1 µm (equivalente en espesor a aproximadamente cuatro ribosomas).

Los tejidos que se deben seccionar para microscopía electrónica generalmente se incorporan en resinas epóxicas. Las secciones se cortan llevando lentamente el bloque de plástico hacia abajo a través de un filo muy cortante (figura 18-16) hecho de vidrio tallado o de una cara de diamante finamente pulida. Las secciones que salen del borde de la cuchilla flotan sobre la superficie de una cubeta de agua que está contenida justo detrás del borde de la cuchilla. Luego, las secciones se recogen con la rejilla de muestra de metal y se secan sobre su superficie. El tejido se tiñe haciendo flotar las rejillas en las gotas de soluciones de los metales pesados, principalmente acetato de uranilo y citrato de plomo. Estos átomos de metales pesados se unen a las macromoléculas y proporcionan la densidad atómica requerida para dispersar el haz de electrones. Además de las tinciones estándar, las secciones de los tejidos pueden tratarse con anticuerpos marcados con metal u otros materiales que reaccionan con moléculas específicas en la sección del tejido. Los estudios con anticuerpos generalmente se llevan a cabo en tejidos incrustados en las resinas acrílicas, que son más permeables a las moléculas grandes que las resinas epóxicas.

### Criofijación y el uso de muestras congeladas

Las células y los tejidos no tienen que fijarse con productos químicos e incrustarse en resinas plásticas para que se puedan observar con el microscopio electrónico. De forma alternativa, las células y los tejidos se pueden congelar rápidamente. Así como un fijador químico detiene los procesos metabólicos y preserva la estructura biológica, también lo hace la congelación rápida, lo que se denomina *criofijación*. Debido a que la criofijación logra estos objetivos sin alterar las macromoléculas de la célula, es menos probable que conduzca a la formación de artefactos. La principal dificultad con la criofijación es la formación de cristales de hielo, que crecen hacia afuera desde los sitios donde se produce la nucleación. A medida que crece un cristal de hielo, destruye los frágiles contenidos de la célula en la que se desarrolla. La mejor manera de evitar la formación de los cristales de hielo es congelar la muestra tan rápidamente que los cristales no tengan tiempo para crecer. Es como si el agua estuviera congelada y aún permaneciera en su estado líquido. Se dice que el agua en este estado está “vitrificada”. Hay varias técnicas empleadas para lograr tales tasas de congelación ultrarrápidas. Las muestras más pequeñas se sumergen normalmente en un líquido de muy baja temperatura (como el propano líquido, con punto de ebullición de −42°C). Las muestras más grandes se tratan mejor con congelación a alta presión. En esta técnica, la muestra se somete a una alta presión hidrostática y se pulveriza con chorros de nitrógeno líquido. La alta presión reduce el punto de congelación del agua, lo que reduce la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo.

Es posible que no piense que un bloque de tejido congelado sería de mucha utilidad para un microscopista, pero se pueden seguir una cantidad sorprendente de métodos para visualizar la estructura celular congelada en el microscopio óptico o electrónico. Por ejemplo, después de una preparación adecuada, un bloque de tejido congelado se puede seccionar con un microtomo

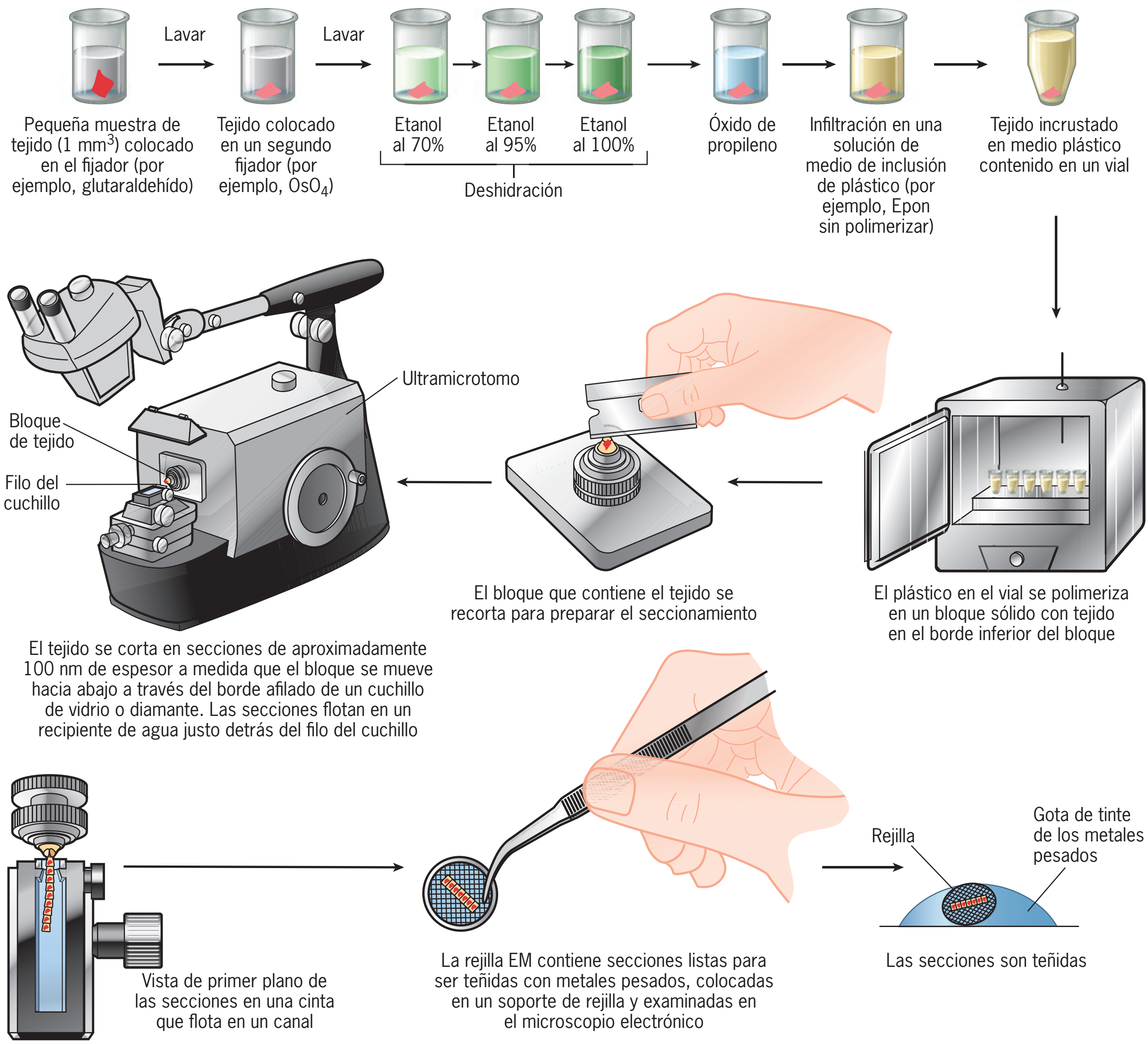



**FIGURA 18-16** **Preparación de una muestra para la observación en el microscopio electrónico.**

especial de una manera similar a la de un bloque de tejido de parafina o plástico. Las secciones congeladas (criosecciones) se pueden preparar para su examen bajo la luz o bajo un microscopio electrónico. Las secciones congeladas son particularmente útiles para estudios sobre las enzimas, cuyas actividades tienden a desnaturalizarse mediante fijadores químicos. Debido a que las secciones congeladas se pueden preparar mucho más rápidamente que las secciones de parafina o de plástico, los patólogos a menudo las emplean para examinar la estructura microscópica de los tejidos extraídos durante la cirugía. Como resultado, la determinación de si un tumor es maligno se puede hacer mientras el paciente todavía está en la mesa de operaciones.

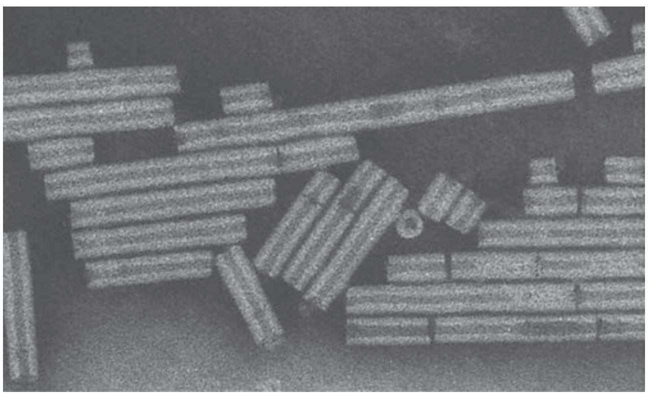
Las células congeladas no tienen que ser seccionadas para revelar la estructura interna. La figura 1.11 muestra una imagen de la delgada región periférica de una célula intacta que se había estado arrastrando sobre la superficie de una rejilla de microscopio electrónico un instante antes de que se congelara rápidamente. A diferencia de la micrografía electrónica estándar, la imagen de la figura 1.11 tiene una tridimensionalidad, como la muestra en sí misma, porque fue generada por una computadora y no directamente por una cámara. Para obtener la imagen, la computadora alinea un gran número de imágenes digitales bidimensionales de la célula que se capturan a medida que la muestra se inclina en ángulos definidos con respecto al eje del haz de los electrones. La reconstrucción computacional tridimensional se llama *tomograma* y la técnica se llama *tomografía crioelectrónica* (*crio-ET*, *cry*oelectron tomography)[1]. La crio-ET, que fue desarrollada por Wolfgang Baumeister del Instituto Max Planck en Alemania, ha revolucionado la forma en que las estructuras intracelulares de tamaño nanométrico se pueden estudiar en las células no fijadas,

[1] Esta técnica es similar en principio a la tomografía axial computarizada (exploraciones CAT), que utiliza una multitud de imágenes de rayos X tomadas desde diferentes ángulos del cuerpo para generar una imagen tridimensional. Afortunadamente, la maquinaria utilizada en la tomografía radiológica permite que la fuente de rayos X y el detector giren, mientras el paciente puede permanecer inmóvil.

completamente hidratadas y congeladas. La crio-ET también puede utilizarse para examinar la organización tridimensional de las estructuras presentes *in vitro*, como lo ejemplificado por la reconstrucción de un polisoma aislado en el acto de traducción que se muestra en la figura 11.50*b*). La crio-ET, que puede ofrecer una resolución de unos pocos nms, proporciona un puente importante entre los mundos celulares y moleculares. Más adelante en esta sección y en la sección 18.16 se analizan otros dos enfoques que requieren el análisis microscópico de las muestras congeladas: la replicación de fracturas por congelación y el análisis de partículas individuales.

## Tinción negativa

El microscopio electrónico también es adecuado para examinar materiales particulados muy pequeños, como virus, ribosomas, enzimas de múltiples subunidades, elementos del citoesqueleto y complejos de proteínas. Las formas de las proteínas individuales y de los ácidos nucleicos también pueden resolverse siempre que se preparen para tener un contraste suficiente con su entorno. Una de las mejores maneras de hacer visibles estas sustancias es emplear procedimientos de **tinción negativa** en los que se acumulan depósitos de metales pesados en todas partes en una rejilla de muestra, excepto donde las partículas están presentes. Como resultado, la muestra se destaca por su brillo relativo en la pantalla de visualización. Ejemplos de muestras teñidas negativamente se presentan en las figuras 2-41*a*) y **18-17*a*)**.



*a*)



*b*)

**FIGURA 18-17 Ejemplos de muestras teñidas negativamente y con sombra de metal.** Micrografías electrónicas de un virus del cascabeleo del tabaco después de una tinción negativa con fosfotungstato de potasio *a*) o de sombra con cromo *b*).

FUENTE: *a-b*) Cortesía de M. K. Corbett.

## Proyección de sombras

Otra técnica para visualizar partículas aisladas es hacer que los objetos proyecten sombras. La técnica se describe en la **FIGURA 18-18**. Las rejillas que contienen las muestras se colocan en una cámara sellada, que luego se evacua mediante una bomba de vacío. La cámara contiene un filamento compuesto de un metal pesado (generalmente platino) junto con carbono. El filamento se calienta a alta temperatura, lo que hace que se evapore y deposite una capa metálica sobre las superficies accesibles dentro de la cámara. Como resultado, el metal se deposita en las áreas que enfrentan al filamento, mientras que las superficies opuestas de las partículas y del espacio de la rejilla a su sombra permanecen sin recubrir. Cuando se ve la cuadrícula en el microscopio electrónico, las áreas en sombra aparecen brillantes en la pantalla de visualización, mientras que las regiones revestidas de metal aparecen oscuras. Esta relación se invierte en la placa fotográfica, que es un negativo de la imagen. La convención para ilustrar las muestras sombreadas es imprimir una imagen negativa en la que la partícula aparece iluminada por una luz blanca brillante (correspondiente a la superficie recubierta) con una sombra oscura proyectada por la partícula (figura 18-17*b*). La técnica proporciona un excelente contraste y produce un efecto tridimensional.

## Replicación por congelación y fractura y grabado por congelación

Como se señaló anteriormente, varias técnicas de microscopía electrónica se han adaptado para trabajar con tejidos congelados. La ultraestructura de las células congeladas se ve a menudo utilizando la técnica de **replicación por congelación y fractura**, que se ilustra en la **FIGURA 18-19** y se demuestra en el tutorial experimental del capítulo 7. Se colocan pequeños trozos de tejido en un pequeño disco metálico y se congelan rápidamente. Luego, el disco se monta en un escenario frío dentro de una cámara de vacío, y el bloque de tejido congelado es golpeado por el filo de una cuchilla. El plano de fractura resultante se extiende desde el punto de contacto, dividiendo el tejido en dos pedazos, no como la forma en que una hoja de hacha divide un pedazo de madera en dos. Considere lo que podría ocurrir cuando un plano de fractura se propaga a través de una célula que contiene una variedad de orgánulos de diferente composición.

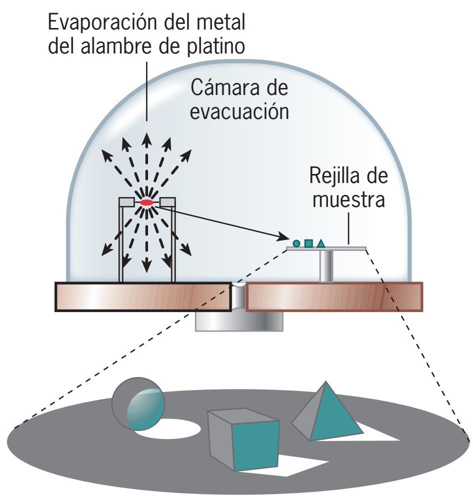



**FIGURA 18-18 Procedimiento utilizado para la proyección de la sombra como medio para proporcionar contraste en el microscopio electrónico.** Este procedimiento se usa a menudo para visualizar partículas pequeñas, como los virus que se muestran en la figura anterior. Las moléculas de DNA y RNA a menudo se hacen visibles mediante una modificación de este procedimiento conocido como sombreado giratorio en el que el metal se evapora en un ángulo muy bajo mientras se gira la muestra.

Estas estructuras tienden a causar desviaciones en el plano de fractura, ya sea hacia arriba o hacia abajo, dando a la fractura elevaciones de cara, depresiones y crestas que reflejan los contornos del protoplasma atravesado. En consecuencia, las superficies expuestas por la fractura contienen información sobre el contenido de la célula. El objetivo es hacer visible esta información. El proceso de *replicación* logra esto utilizando la zona fracturada como una plantilla en la que se deposita una capa de metales pesados. El metal pesado se coloca sobre la superficie recién expuesta del tejido congelado en la misma cámara donde se fracturó el tejido. El metal se deposita en un ángulo para proporcionar sombras que acentúan la topografía local (**FIGURA 18-20**), como se describe en la sección anterior sobre la proyección de sombras.

Luego se deposita una capa de carbono sobre la capa metálica para cementar los parches de metal en una superficie sólida. Una vez hecho este molde, el tejido que proporcionó la plantilla se puede descongelar, extraer y desechar; es la **réplica** de metal-carbono que se coloca en la rejilla de la muestra y se ve en el microscopio electrónico. Las variaciones en el grosor del metal en diferentes partes de la réplica causan variaciones en el número de electrones que penetran para llegar a la pantalla de visualización, produciendo el contraste necesario en la imagen. Como se discutió en el capítulo 4, los planos de fractura toman el camino de menor resistencia a través del bloque congelado, que a menudo los transporta por el centro de las membranas celulares. Como resultado, esta técnica es particularmente adecuada para examinar la distribución de las proteínas integrales de la membrana, ya que abarcan la bicapa lipídica (como en las figuras 4.15, 7.27, 7.28 y 7.29). Dichos estudios, realizados por Daniel Branton y otros desempeñaron un rol importante en la formulación de la estructura de mosaico fluido de las membranas celulares a principios de la década de 1970 (página 117).

La replicación por congelación y fractura en sí misma es una técnica extremadamente valiosa, pero se puede hacer aún más informativa al incluir un paso llamado **grabado por congelación** (figura 18-19). En este paso, la muestra congelada y fracturada, mientras está en su lugar dentro de la cámara fría, se expone a un vacío a una temperatura elevada durante uno a unos pocos minutos, en los cuales una capa de hielo de la superficie expuesta puede evaporarse (sublimarse). Una vez que se ha retirado algo

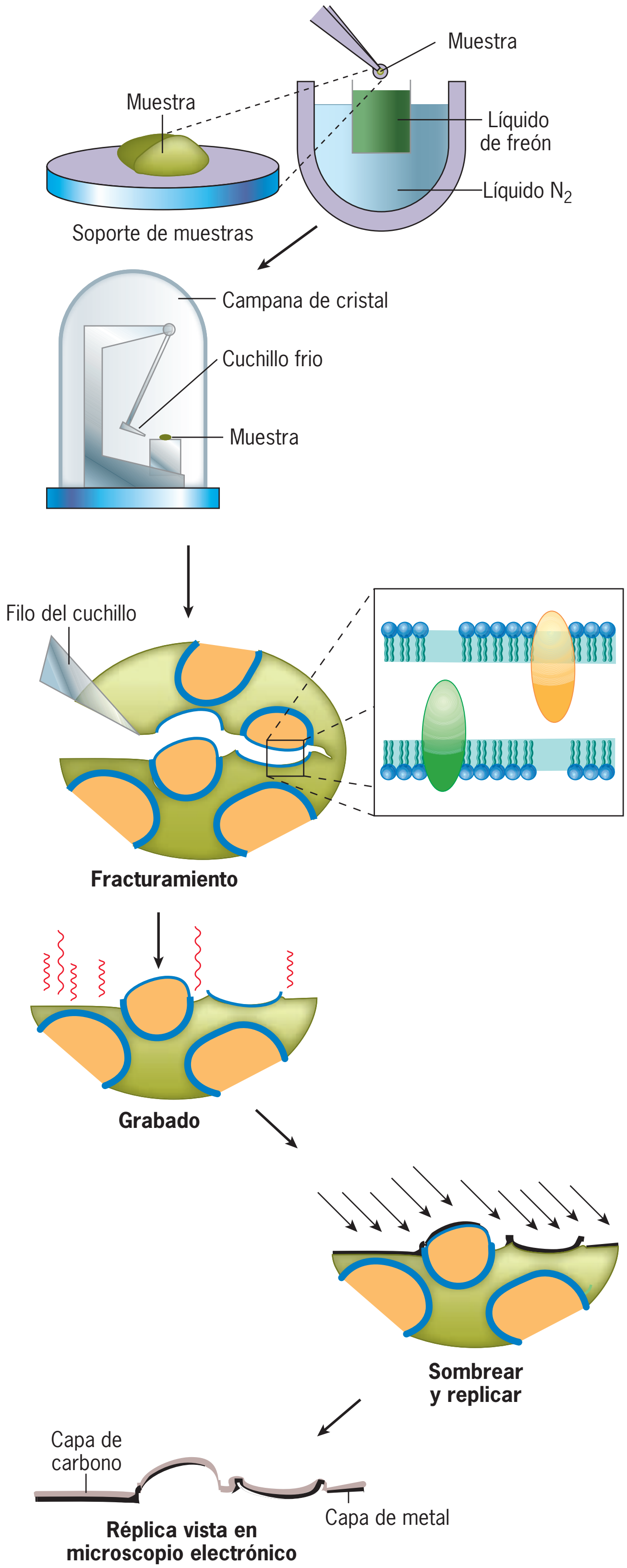



**FIGURA 18-19 Procedimiento para la formación de réplicas de congelación y fractura como se describe en el texto.** El grabado por congelación es un paso opcional en el que se evapora una capa delgada de hielo para revelar información adicional sobre la estructura de la muestra fracturada.

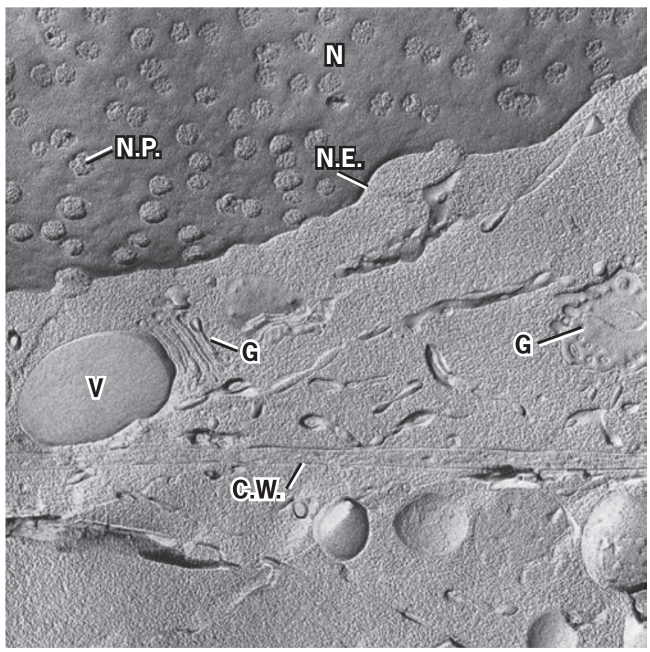



**FIGURA 18-20** Réplica de una célula de raíz de cebolla fracturada por congelación que muestra la envoltura nuclear (N.E., *nuclear envelope*) con sus poros (N.P., *nuclear pores*), el complejo de Golgi (G, *Golgi complex*), una vacuola citoplasmática (V, *vacuole*) y la pared celular (C.W., *cell wall*). FUENTE: Cortesía de Daniel Branton, Harvard University.

del hielo, la superficie de la estructura se puede recubrir con un metal pesado y carbono para crear una réplica metálica que revela la superficie externa y la estructura interna de las membranas celulares. El desarrollo por parte de John Heuser de las técnicas de *grabado profundo*, en las cuales se eliminan mayores cantidades de hielo en la superficie, permitió una mirada fascinante a los orgánulos celulares. Ejemplos de muestras preparadas por esta técnica se observan en las **FIGURAS 18-21**, 8-38 y 9-38, donde se puede ver que las partes individuales de la célula se destacan en un profundo relieve sobre el fondo. La técnica ofrece una resolución muy alta y puede usarse para revelar la estructura y la distribución de los complejos macromoleculares, como los del citoesqueleto, como se presume que existe dentro de la célula viva.

## 18.6 Microscopía electrónica de barrido

El TEM se ha explotado más ampliamente en el examen de la estructura interna de las células. En contraste, el microscopio electrónico de barrido (SEM, *scanning electron microscope*) se utiliza principalmente para examinar las superficies de objetos que varían en tamaño desde un virus hasta una cabeza de un animal (**FIGURA 18-22**). La construcción y el funcionamiento del SEM son muy diferentes de los del TEM. El objetivo de la preparación de la muestra para el SEM es producir un objeto que tenga la misma forma y propiedades de superficie que en el estado vivo, pero carece de líquido, como se requiere para observar la muestra bajo vacío. Debido a que el agua constituye un porcentaje tan alto del peso de las células vivas y está presente en asociación con prácticamente todas las macromoléculas, su eliminación puede tener un efecto muy destructivo en la estructura celular. Cuando las células simplemente se secan al aire, la destrucción resulta en

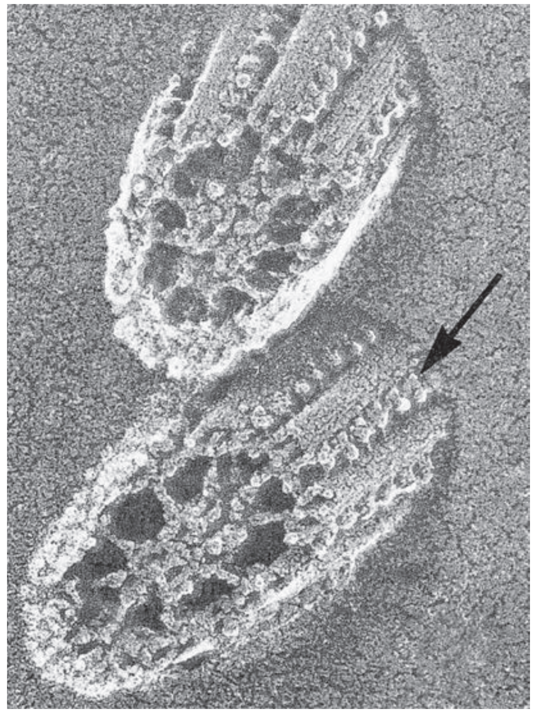
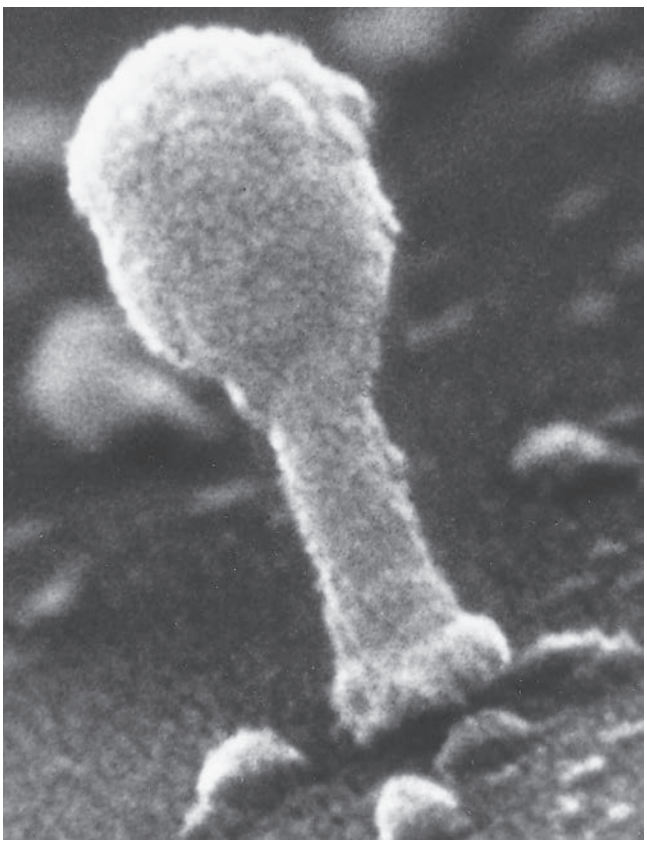
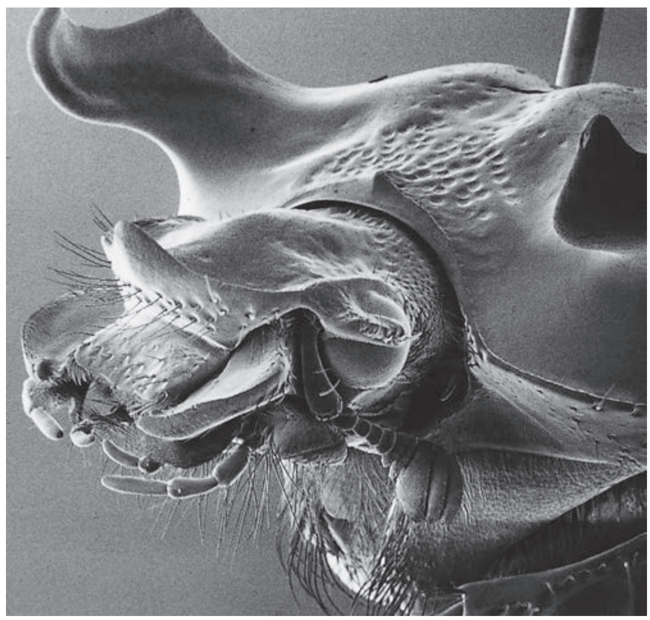


**FIGURA 18-21 Grabado profundo. Micrografía electrónica de los axonemas ciliares del protozoo *Tetrahymena*.** Los axonemas se fijaron, se congelaron y se fracturaron, y el agua congelada en la superficie del bloque fracturado se evaporó, dejando una porción de los axonemas destacándose en relieve, como se visualiza en esta réplica de metal. La flecha indica una fila distinta de brazos externos de dineína.

FUENTE: De Ursula W. Goodenough y John E. Heuser, J. Cell Biol. 95:800, 1982, Fig. 3, Foto derecha. Reproducido con permiso de Rockefeller University Press.



*a*)



*b*)

**FIGURA 18-22 Microscopía electrónica de barrido.** Micrografías electrónicas de barrido de *a*) un bacteriófago T4 (275 000x) y *b*) la cabeza de un insecto (40x).

FUENTE: *a*) Desde A. N. Broers, B. J. Panessa, y J. F. Gennaro, Science 189: 635, 1975; © 1975. Reproducido con permiso de AAAS; b) cortesía de H. F. Howden and L. E. C. Ling.

gran parte por la tensión superficial en las interfaces aire-agua. Las muestras a examinar en el SEM se fijan, se pasan a través de una serie de alcoholes y luego se secan mediante un proceso de *secado de punto crítico*. El punto crítico de secado aprovecha el hecho de que existe una temperatura y presión críticas para cada solvente en el que la densidad del vapor es igual a la densidad del líquido. En este punto, no hay tensión superficial entre el gas y el líquido. El solvente de las células se reemplaza con un fluido líquido de transición (generalmente dióxido de carbono), que se vaporiza a presión para que las células no estén expuestas a ninguna tensión superficial que pueda distorsionar su configuración tridimensional.

Una vez que se seca la muestra, se recubre con una capa delgada de metal, lo que la hace adecuada como objetivo para un haz de electrones. En el TEM, el haz de electrones es enfocado por las lentes del condensador para iluminar simultáneamente todo el campo de visión. En el SEM, los electrones se aceleran como un haz fino que escanea la muestra. En TEM, los electrones pasan a través de la muestra para formar la imagen. En el SEM, la imagen está formada por los electrones que se reflejan de nuevo desde la muestra (retrodispersado) o por los electrones secundarios emitidos por esta después de ser golpeados por el haz de electrones primario. Estos electrones chocan contra un detector que está ubicado cerca de la superficie de la muestra.

La formación de imágenes en el SEM es indirecta. Además del haz que escanea la superficie de la muestra, otro haz de electrones escanea de modo sincrónico la cara de un tubo de cátodo, produciendo una imagen similar a la vista en una pantalla de televisión. Los electrones que rebotan en la muestra y alcanzan el detector controlan la fuerza del haz en el tubo de cátodo. Cuantos más electrones se recojan de la muestra en un punto dado, más fuerte será la señal que enviará a la unidad y aumentará la intensidad del haz en la pantalla en el lugar correspondiente. El resultado es una imagen en la pantalla que refleja la topología superficial de la muestra, porque es esta topología (las grietas, las colinas y las fosas) la que determina el número de electrones recolectados de las distintas partes de la superficie.

Como es evidente en las micrografías de la figura 18-22, un SEM puede proporcionar un gran rango de ampliación (de aproximadamente 15 a 150 000 veces para un instrumento estándar). El poder de resolución de un SEM está relacionado con el diámetro del haz de electrones. Los modelos más recientes son capaces de entregar resoluciones de menos de 5 nm, que se pueden usar para localizar anticuerpos marcados con oro unidos a la superficie de una célula. El SEM también proporciona una profundidad de enfoque notable, aproximadamente 500 veces la del microscopio óptico con un aumento correspondiente. Esta propiedad da a las imágenes SEM su calidad tridimensional. En el nivel celular, el SEM permite al observador apreciar la estructura de la superficie externa de la célula y todos los diversos procesos, las extensiones y los materiales extracelulares que interactúan con el ambiente.

## 18.7 Microscopía de fuerza atómica

Aunque no es un microscopio electrónico, el **microscopio de fuerza atómica** (**AFM**, *atomic force microscope*) es un instrumento de escaneo de alta resolución que se está volviendo cada vez más importante en nanotecnología y biología molecular. Se pueden encontrar varias imágenes derivadas de AFM en el texto, incluidas las figuras 4.24*a*), 5.25, 7.29*c*) y 9.44. El AFM funciona al escanear una punta (sonda) microscópica y afilada sobre la superficie de la muestra. En un tipo de AFM, la sonda está unida a un pequeño haz oscilante (o voladizo), cuya frecuencia de oscilaciones cambia a medida que la punta encuentra variaciones en la topografía de la muestra. Estos cambios en la oscilación del haz se pueden convertir en una imagen topográfica tridimensional de la superficie de la muestra. A diferencia de otras técnicas para la determinación de la estructura molecular, como la cristalografía de rayos X y la crio-EM, que promedian la estructura de muchas moléculas individuales, el AFM proporciona una imagen de cada molécula individual según se orienta en el campo (véase figura 5.25). Otra limitación de las tecnologías de microscopía electrónica y cristalografía de rayos X es que solo son capaces de proporcionar imágenes estáticas o "instantáneas". El desarrollo del AFM de alta velocidad (HS-AFM, *high-speed AFM*), que se muestra esquemáticamente en la figura 18-23, ahora permite a los investigadores obtener imágenes secuenciales rápidas de una macromolécula para que su actividad pueda seguirse en tiempo real. Esta técnica se ilustra con elegancia en las micrografías de la figura 9.44, que representan los pasos que toma una única molécula de miosina V a medida que se mueve a lo largo de un filamento de actina. La oportunidad de ver una "película" de una proteína individual mientras desarrolla sus actividades normales es un logro notable en un campo que ha estado estudiando la estructura de estas moléculas durante más de medio siglo.

La sonda de un AFM se puede usar como un dispositivo de monitoreo; también se puede emplear como un "nanomanipulador" para empujar o jalar la muestra en un intento de medir varias propiedades mecánicas. Esta capacidad se usó para mostrar que un solo filamento intermedio puede estirarse varias veces su longitud normal. En un protocolo diferente, la punta del AFM se puede recubrir con ligandos para un receptor particular, y se pue-

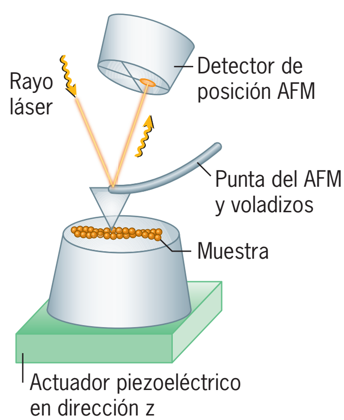



**FIGURA 18-23 Microscopía de fuerza atómica de alta velocidad.** Los elementos básicos de un HS-AFM se muestran en este dibujo esquemático. La muestra se monta en un componente (el actuador piezoeléctrico) que está unido a la plataforma del microscopio (no se muestra). Las señales del actuador hacen que el voladizo oscile hacia arriba y hacia abajo, de modo que la punta del AFM haga contacto intermitente con la muestra a medida que explora la superficie de la muestra. Las fuerzas que se desarrollan entre la muestra y la punta del AFM causan desviaciones de la punta, que son detectadas por un rayo láser que se refleja en la parte posterior de la punta del AFM. Los movimientos en la posición del rayo láser, que reflejan las diferencias topográficas a lo largo de la superficie de la muestra, son reconocidos por un detector de posición y esta información se utiliza para construir una imagen de la muestra. La película, basada en AFM, del movimiento de una molécula de miosina V que se muestra en la figura 9.44 fue "filmada" a aproximadamente 7 cuadros por segundo.

FUENTE: C. Veigel y C. F. Schmidt, Nature Revs. Mol. Cell Biol. 12: 166, 2011; copyright 2011. Nature Reviews Molecular Cell Biology by Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group in the format reuse in a book/textbook via Copyright Clearance Center.

den realizar mediciones de la afinidad de ese receptor para el ligando en cuestión.

## 18.8 El uso de radioisótopos

Un trazador es una sustancia que revela su presencia de una manera u otra y, por tanto, se puede localizar o monitorear durante el curso de un experimento. Dependiendo de la sustancia y el tipo de experimento, un trazador podría estar marcado con fluorescencia, marcado con giro, marcado con densidad, o marcado radiactivamente. En cada caso, un grupo marcado permite detectar una molécula sin afectar la especificidad de sus interacciones. Las moléculas radiactivas, por ejemplo, participan en las mismas reacciones que las especies no radiactivas, pero se puede seguir su ubicación y se puede medir la cantidad presente.

La identidad de un átomo (ya sea un átomo de hierro, un átomo de cloro o de algún otro tipo) y, por tanto, sus propiedades químicas, están determinadas por el número de protones cargados positivamente en su núcleo. Todos los átomos de hidrógeno tienen un solo protón, todos los átomos de helio tienen dos protones, todos los átomos de litio tienen tres protones, etc. Sin embargo, no todos los átomos de hidrógeno, helio o litio tienen el mismo número de neutrones. Se dice que los átomos que tienen el mismo número de protones y diferentes números de neutrones son *isótopos* entre sí. Incluso el hidrógeno, el elemento más simple, puede existir como tres isótopos diferentes, dependiendo de si el átomo tiene 0, 1 o 2 neutrones en su núcleo. De estos tres isótopos de hidrógeno, solo el tritio ($^{3}H$), que contiene dos neutrones, es radiactivo.

Los isótopos son radiactivos cuando contienen una combinación inestable de protones y neutrones. Los átomos que son inestables tienden a romperse o desintegrarse, logrando así una configuración más estable. Cuando un átomo se desintegra, libera partículas o radiación electromagnética que puede ser monitoreada por los instrumentos apropiados. Los isótopos radiactivos aparecen en la tabla periódica de elementos y se pueden producir en el laboratorio a partir de elementos no radiactivos. Muchas moléculas biológicas se consiguen en un estado radiactivo, es decir, que contienen uno o más átomos radiactivos como parte de su estructura.

La **vida media ($t_{1/2}$)** de un radioisótopo es una medida de su inestabilidad. Cuanto más inestable sea un isótopo en particular, mayor será la probabilidad de que un átomo dado se desintegre en un tiempo determinado. Si se comienza con un Curie[2] de tritio, la mitad de la cantidad del material radiactivo se perderá después de aproximadamente 12 años (que es la vida media de este radioisótopo). En los primeros años de investigación sobre la fotosíntesis y otras vías metabólicas, el único radioisótopo de carbono disponible fue el $^{11}C$, que tiene una vida media de aproximadamente 20 minutos. Los experimentos con $^{11}C$ se llevaron a cabo literalmente en la carrera para que la cantidad de isótopo incorporado se pudiera medir antes de que la sustancia desapareciera. La disponibilidad en la década de 1950 del $^{14}C$, un radioisótopo que tiene una vida media de 5 700 años, fue recibida con gran celebración. Los radioisótopos de mayor importancia en la investigación biológica celular se enumeran en la tabla 18-1, junto con información sobre su vida media y la naturaleza de su radiación.

Los átomos pueden liberar tres formas principales de radiación durante su desintegración. El átomo puede liberar una *partícula alfa*, que consta de dos protones y dos neutrones y es equivalente al núcleo de un átomo de helio; una *partícula beta*, que es

**TABLA 18-1 Propiedades de una variedad de radioisótopos utilizados en la investigación biológica**

| Símbolo y peso atómico | Vida media | Tipo de partícula(s) emitida |
|---|---|---|
| $^{3}H$ | 12.3 años | Beta |
| $^{11}C$ | 20 minutos | Beta |
| $^{14}C$ | 5 700 años | Beta |
| $^{24}Na$ | 15.1 horas | Beta, gamma |
| $^{32}P$ | 14.3 días | Beta |
| $^{35}S$ | 87.1 días | Beta |
| $^{42}K$ | 12.4 horas | Beta, gamma |
| $^{45}Ca$ | 152 días | Beta |
| $^{59}Fe$ | 45 días | Beta, gamma |
| $^{60}Co$ | 5.3 años | Beta, gamma |
| $^{54}Cu$ | 12.8 horas | Beta, gamma |
| $^{65}Zn$ | 250 días | Beta, gamma |
| $^{13}1I$ | 8.0 días | Beta, gamma |

equivalente a un electrón; y/o la *radiación gamma*, que consiste en una radiación electromagnética o fotones. Los isótopos más utilizados son los emisores beta, que se controlan mediante cualquiera de las dos metodologías diferentes: espectrometría de centelleo líquido o autorradiografía.

La *espectrometría de centelleo líquido* se usa para medir la cantidad de radiactividad en una muestra dada. La técnica se basa en la propiedad de ciertas moléculas, denominadas *fósforos* o *centelleantes*, para absorber parte de la energía de una partícula emitida y liberar esa energía en forma de luz. Al preparar una muestra para el recuento del centelleo líquido, se mezcla la muestra con una solución de fósforo en un vial de centelleo de vidrio o plástico. Esto hace que el fósforo y el isótopo radiactivo entren en contacto muy cercano, de modo que la radiación incluso de los emisores beta más débiles se pueden medir de manera eficiente. Una vez mezclado, el vial se coloca en el instrumento de conteo, donde se introduce en un pozo cuyas paredes contienen un fotodetector extremadamente sensible. A medida que los átomos radiactivos dentro del vial se desintegran, las partículas emitidas activan los centelleantes, que emiten destellos de luz. La luz es detectada por una fotocélula, y la señal es amplificada por un tubo fotomultiplicador dentro del contador. Después de corregir el ruido de fondo, la cantidad de radiactividad presente en cada vial se muestra en una impresión.

La **autorradiografía** es una técnica de base amplia utilizada para determinar dónde se localiza un isótopo particular, ya sea en una célula, en un gel de poliacrilamida o en un filtro de nitrocelulosa. La importancia de la autorradiografía en los primeros descubrimientos sobre las actividades sintéticas de las células se describió en los experimentos de búsqueda pulsada en la página 260. La autorradiografía aprovecha la capacidad de una partícula emitida por un átomo radiactivo para activar una emulsión fotográfica, como la luz o los rayos X activan la emulsión que recubre un trozo de película. Si la emulsión fotográfica se pone en contacto cercano con una fuente radiactiva, las partículas emitidas por la fuente dejan pequeños granos de plata negra en la emulsión después del desarrollo fotográfico. La autorradiografía se utiliza para localizar radioisótopos en las secciones de tejido que se han inmovilizado en un portaobjetos o rejilla TEM. Los pasos involucrados en la preparación de una autorradiografía microscópica de luz son los siguientes. La emulsión se aplica a las secciones de la diapositiva o rejilla como una capa superpuesta muy delgada, y la muestra se coloca en un recipiente a prueba de luz para permitir que la emulsión quede expuesta a las emisiones. Cuanto más tiempo se quede la muestra antes del desarrollo de los granos de plata, mayor será el número de granos de plata que se forman. Cuando se examina la diapositiva o la rejilla desarrollada en el microscopio, la ubicación de los granos de plata en la capa de emulsión justo encima

[2] Un Curie es la cantidad de radiactividad requerida para producir $3.7 \times 10^{10}$ desintegraciones por segundo.

del tejido indica la ubicación de la radiactividad en las células subyacentes. En la figura 8-3*a*) se muestra una micrografía de microscopía electrónica que utiliza esta técnica.



## 18.9 Cultivo celular

A lo largo de este libro, hemos enfatizado el enfoque en biología celular que intenta comprender procesos particulares mediante su análisis en un sistema *in vitro* simplificado, controlado. El mismo enfoque puede aplicarse al estudio de las células en sí mismas, ya que también pueden aislarse de las influencias a las que están normalmente sujetas dentro de un organismo multicelular complejo. Aprender a cultivar células fuera del organismo, es decir, en **cultivos celulares**, ha demostrado ser uno de los logros técnicos más valiosos en todo el estudio de la biología. Un vistazo rápido a través de cualquier revista en biología celular revela que la mayoría de los artículos describen investigaciones realizadas en células cultivadas. Las razones de esto son numerosas: las células cultivadas se pueden obtener en gran cantidad; la mayoría de los cultivos contienen un solo tipo de célula; muchas actividades celulares diferentes, como la endocitosis, el movimiento celular, la división celular, el transporte a través de las membranas y la síntesis macromolecular, se pueden estudiar en cultivos celulares; las células pueden diferenciarse en el cultivo; y las células cultivadas responden al tratamiento con los medicamentos, las hormonas, los factores de crecimiento y otras sustancias activas.

Los primeros en cultivar el tejido emplearon medios que contenían una gran variedad de sustancias desconocidas. El crecimiento celular se logró mediante la adición de fluidos obtenidos de los sistemas vivos, como los linfocitos, el suero sanguíneo y los homogenados de embriones. Se encontró que las células requerían una variedad considerable de nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y cofactores para mantenerse saludables y proliferar. Incluso hoy día, la mayoría de los medios de cultivo contienen grandes cantidades de suero. La importancia del suero (o los factores de crecimiento que contiene) en la proliferación de células cultivadas se muestra en las curvas de crecimiento de las células en la figura 16-4.

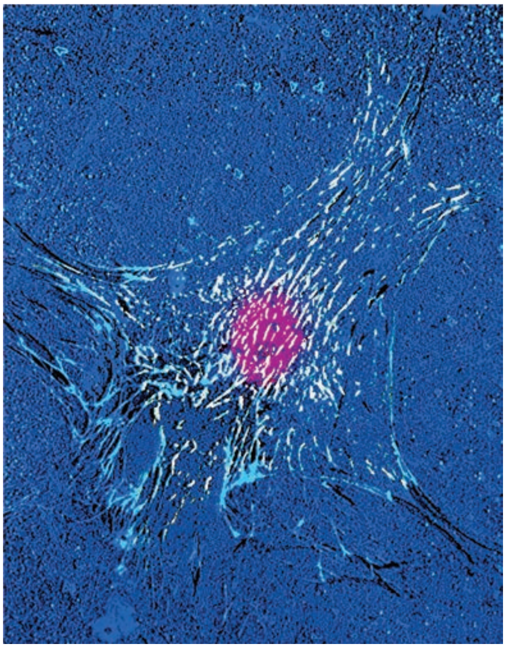
Uno de los objetivos principales de los cultivadores celulares ha sido desarrollar medios definidos libres de suero que respalden el crecimiento de las células. Usando un enfoque pragmático en el que se prueban combinaciones de diversos ingredientes para determinar su capacidad para sostener el crecimiento y la proliferación celular, un número creciente de tipos de células se ha cultivado con éxito en medios "artificiales" que carecen de suero u otros fluidos naturales. Como se esperaría, la composición de estos medios químicamente definidos es relativamente compleja; consisten en una mezcla de nutrientes y vitaminas, junto con una variedad de proteínas purificadas, que incluyen insulina, factor de crecimiento epidérmico y transferrina (que proporciona hierro a las células).

Debido a que son tan ricos en nutrientes, los medios de cultivo de los tejidos son un hábitat muy atractivo para el crecimiento de los microorganismos. Para evitar que las bacterias contaminen los cultivos celulares, los cultivadores de tejidos deben hacer grandes esfuerzos para mantener las condiciones estériles dentro de su espacio de trabajo. Esto se logra esterilizando guantes y todos los suministros e instrumentos, empleando bajos niveles de antibióticos en los medios y trabajando dentro de una campana estéril. El primer paso en el cultivo celular es obtener las células. En la mayoría de los casos, sólo es necesario retirar un vial de células congeladas, previamente cultivadas, de un tanque de nitrógeno líquido, descongelar el vial y transferir las células al medio en espera. Un cultivo de este tipo se conoce como un **cultivo secundario** porque las células se derivan de un cultivo anterior. En un **cultivo primario**, por otro lado, las células se obtienen directamente del organismo. La mayoría de los cultivos primarios de células animales se obtienen de embriones, cuyos tejidos se disocian más fácilmente en células individuales que en los adultos. La disociación se logra con la ayuda de una enzima proteolítica, como la tripsina, que digiere los dominios extracelulares de las proteínas que median la adhesión celular (capítulo 7). Luego, el tejido se lava sin la enzima y generalmente se suspende en una solución salina que carece de iones de $Ca^{2+}$ y contiene una sustancia, como el tetraacetato de etilendiamina (EDTA, *ethylenediamine tetraacetate*), que se une a los iones de calcio (quelatos). Como se discutió en el capítulo 7, los iones de calcio desempeñan un papel clave en la adhesión célula a célula, y su eliminación de los tejidos facilita enormemente la separación de las células.

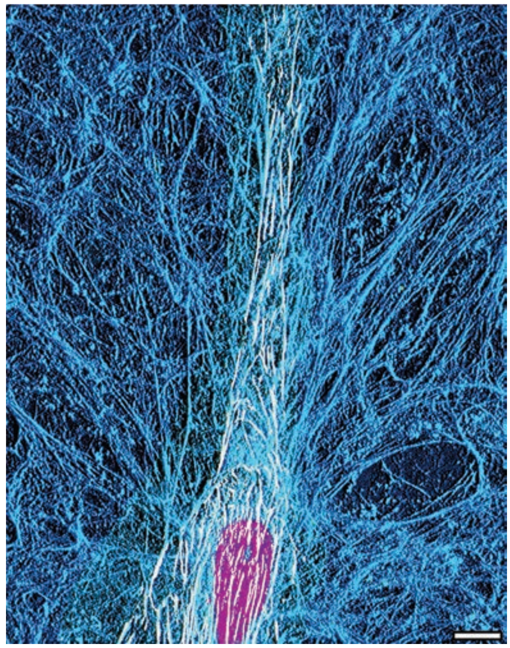
Las células normales (no malignas) pueden dividirse un número limitado de veces (típicamente de 50 a 100) antes de que sufran senescencia y muerte (página 475). Debido a esto, muchas de las células que se usan comúnmente en estudios de cultivo de tejidos han sufrido modificaciones genéticas que les permiten crecer de forma indefinida. Las células de este tipo se denominan **líneas celulares** y, por lo general, se convierten en tumores malignos cuando se inyectan en animales de laboratorio susceptibles. La frecuencia con la que una célula normal que crece en el cultivo se transforma espontáneamente en una línea celular depende del organismo del cual se derivó. Las células del ratón, por ejemplo, se transforman a una frecuencia relativamente alta; las células humanas sólo se transforman raramente, si es que alguna vez lo hacen. Las líneas celulares humanas (por ejemplo, las células HeLa, discutidas en el comienzo del capítulo 16) se derivan típicamente de tumores humanos o de células tratadas con virus o químicos que causan cáncer.

Varios laboratorios se están alejando de los sistemas de cultivo *bidimensionales* tradicionales, donde las células se siembran en la superficie plana de una placa preparada, para utilizar los cultivos *tridimensionales*, en los que las células se plantan en una matriz tridimensional de materiales extracelulares sintéticos y/o naturales. Estos materiales se pueden comprar como productos que contienen proteínas y otros componentes derivados de las membranas basales naturales (figuras 7.4 y 7.8). Las células dentro del cuerpo no viven en superficies planas, de plástico duro y, en consecuencia, se piensa que las matrices tridimensionales proporcionan un entorno mucho más natural para las células cultivadas. Por ello, la morfología y el comportamiento de las células en estos entornos tridimensionales se parecen más a los de las células observadas dentro de los tejidos del cuerpo. Esto se refleja en las diferencias en la organización del citoesqueleto, los tipos de adherencias celulares, las actividades de señalización y los estados de diferenciación de las células en los dos tipos de sistemas de cultivo. Además, los sistemas de cultivo en 3D también son más adecuados para estudiar las interacciones entre células porque permiten que estas entren en contacto entre sí en cualquier punto a lo largo de su superficie. La **FIGURA 18-24** muestra las imágenes de fibroblastos humanos crecidos en una superficie plana o dentro de una matriz tridimensional. La célula en la **FIGURA 18-24*a*)** se presionó contra el sustrato, creando una superficie superior (dorsal) e inferior (ventral) muy antinatural con lamelipodios inusualmente amplios y aplanados. En contraste, el mismo tipo de célula que crece en el cultivo en 3D (figura 18-24*b*) tiene una estructura en forma de huso típica sin ninguna diferenciación en la superficie obvia.

Muchos tipos diferentes de células vegetales también pueden crecer en cultivo. En un enfoque, las células vegetales se tratan con la enzima celulasa, que digiere la pared celular circundante, liberando la célula desnuda o **protoplasto**. Los protoplastos se pueden cultivar en un medio químicamente definido que promueve su crecimiento y división. Bajo condiciones adecuadas, las células pueden crecer en un grupo de células indiferenciadas, llamadas *callos*, que pueden inducirse a desarrollar brotes a partir de los cuales una planta puede regenerarse. En un enfoque alternativo, las células en el tejido de la hoja pueden inducirse por



*a*)



*b*)

**FIGURA 18-24 Una comparación de la morfología de las células que crecen en cultivos 2D frente a 3D,** *a*) Un fibroblasto humano que crece en un sustrato plano recubierto de fibronectina en cultivo 2D asume una forma altamente aplanada con lamelipodios amplios. Las adherencias que contienen integrina aparecen blancas. *b*) El mismo tipo de células que crecen en una matriz 3D asume una morfología no aplanada en forma de huso. La matriz extracelular de fibronectina aparece en azul. La barra es igual a 10 μm.

FUENTE: *a-b*) De Edna Cukierman, Cell 130:603, 2007, Fig. 1, reimpreso con permiso de Elsevier. Cortesía de Kenneth M. Yamada, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH.

tratamiento hormonal para perder sus propiedades diferenciadas y se convierten en el material de los callos. El callo se puede transferir a medios líquidos para iniciar un cultivo celular.

## 18.10 El fraccionamiento de los contenidos de una célula por centrifugación diferencial

La mayoría de las células contienen una variedad de orgánulos diferentes. Si se propone estudiar una función particular de las mitocondrias o aislar una enzima particular del complejo de Golgi, es útil aislar primero el orgánulo relevante en un estado purificado. El aislamiento de un orgánulo particular en grandes cantidades se logra generalmente mediante la técnica de **centrifugación diferencial**, que depende del principio de que, mientras sean más densos que el medio circundante, las partículas de diferente tamaño y forma viajan hacia el fondo de un tubo de centrífuga cuando se coloca en un campo centrífugo a diferentes velocidades.

Para llevar a cabo esta técnica, las células primero se rompen mediante ruptura mecánica, generalmente utilizando un *homogeneizador* mecánico. Las células se homogeneizan con una solución tamponada isotónica (que a menudo contiene sacarosa), que evita la ruptura de las vesículas de la membrana debido a la ósmosis. El homogeneizado se somete luego a una serie de centrifugaciones secuenciales al aumentar las fuerzas centrífugas. Los pasos en esta técnica se discutieron en el capítulo 8 y se ilustran en la figura 8.5. Inicialmente, el homogeneizado se somete a bajas fuerzas centrífugas durante un corto periodo, de modo que sólo los orgánulos celulares más grandes, como los núcleos (y las células completas restantes), se sedimentan en un precipitado. A mayores fuerzas centrífugas, los organelos citoplásmicos relativamente grandes (mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y peroxisomas) pueden ser expulsados de la suspensión (figura 8.5). En pasos posteriores, los microsomas (los fragmentos de las membranas vacuolares y reticulares del citosol) y los ribosomas se eliminan de la suspensión. Este último paso requiere la ultracentrífuga, que puede generar velocidades de 75 000 revoluciones por minuto, produciendo fuerzas equivalentes a 500 000 veces la de la gravedad. Una vez que se han eliminado los ribosomas, el sobrenadante consiste en la fase soluble de la célula y esas partículas son demasiado pequeñas para ser eliminadas por sedimentación.

Los pasos iniciales de la centrifugación diferencial no producen preparaciones puras de un orgánulo particular, por lo que generalmente se requieren pasos adicionales. En muchos casos, la purificación adicional se logra mediante la centrifugación de una de las fracciones a través de un gradiente de densidad, como se muestra en la **FIGURA 18-25**, que distribuye el contenido simple en varias capas según su densidad. La composición de varias fracciones se puede determinar mediante examen microscópico,

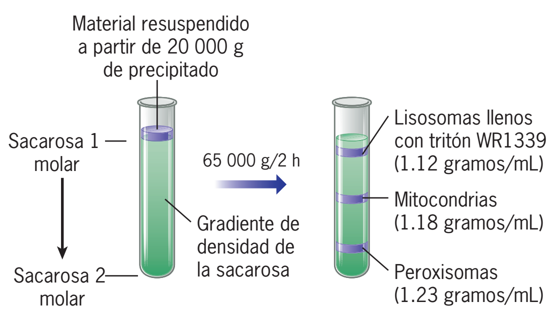



**FIGURA 18-25 Purificación de las fracciones subcelulares mediante centrifugación en equilibrio de densidad-gradiente.** En este ejemplo particular, el medio está compuesto por un gradiente continuo de densidad de sacarosa y los diferentes orgánulos se sedimentan hasta que alcanzan un lugar en el tubo igual a su propia densidad, donde forman bandas. El precipitado de 20 000 g se obtiene como se muestra en la figura 8.5.

o midiendo las cantidades de proteínas particulares que son específicas para los orgánulos particulares.

Los orgánulos celulares aislados por centrifugación diferencial conservan un nivel notablemente alto de actividad normal, siempre que no estén expuestos a condiciones de desnaturalización durante su aislamiento. Los orgánulos aislados mediante este procedimiento pueden usarse en *sistemas libres de células* para estudiar una amplia variedad de actividades celulares, incluida la síntesis de proteínas unidas a la membrana (página 263), la formación de vesículas de transporte (página 279), la síntesis de DNA (página 527) y el transporte de solutos y el desarrollo de gradientes iónicos (véase figura 5.23).



## 18.11 Purificación y caracterización de proteínas mediante cromatografía líquida en columna

Durante el curso de este libro, hemos considerado las propiedades de muchas proteínas diferentes. Antes de poder obtener información sobre la estructura o función de una proteína en particular, esta debe aislarse en un estado relativamente puro. Debido a que la mayoría de las células contienen miles de proteínas diferentes, la purificación de una sola especie puede ser una misión desafiante, particularmente si la proteína está presente en la célula a baja concentración. En esta sección, examinaremos brevemente algunas de las técnicas utilizadas para purificar las proteínas.

La purificación de una proteína generalmente se realiza mediante la eliminación gradual de los contaminantes. Dos proteínas pueden ser muy similares en una propiedad, como la carga general, y muy diferentes en otra propiedad, como el tamaño molecular o la forma. En consecuencia, la purificación completa de una proteína dada por lo general requiere el uso de técnicas sucesivas que aprovechan las diferentes propiedades de las proteínas separadas. La purificación se mide como un aumento de la **actividad específica**, que es la relación entre la cantidad de esa proteína y la cantidad total de proteína presente en la muestra. Se debe utilizar alguna característica identificable de la proteína específica como un **ensayo** para determinar la cantidad relativa de esa proteína en la muestra. Si la proteína es una enzima, su actividad catalítica se puede usar como un ensayo para controlar la purificación. Alternativamente, los ensayos pueden basarse en criterios inmunológicos, electroforéticos, de microscopía electrónica u otros. Las mediciones de la proteína total en una muestra se pueden hacer usando varias propiedades, incluido el nitrógeno total, que se pueden medir con mucha precisión y es bastante constante en aproximadamente 16% del peso seco para todas las proteínas.

**Cromatografía** es un término para una variedad de técnicas en las que una mezcla de componentes disueltos se fracciona a medida que se mueve a través de algún tipo de matriz porosa. En las técnicas de cromatografía líquida, los componentes de una mezcla pueden asociarse con una de dos fases alternativas: fase móvil, que consiste en un disolvente en movimiento, y fase inmóvil, en la matriz a través de la cual se mueve el disolvente.[3] En los procedimientos cromatográficos que se describen a continuación, la fase inmóvil radica en materiales que se empaquetan en una columna. Las proteínas a fraccionar se disuelven en un disolvente y luego pasan a través de la columna. Los materiales que componen la fase inmóvil contienen sitios a los que se pueden unir las proteínas en solución. A medida que las moléculas de las proteínas individuales interactúan con los materiales de la matriz, su progreso a través de la columna se retrasa. Por tanto, cuanto mayor es la afinidad de una proteína particular por el material de la matriz, más lento es su paso a través de la columna. Debido a que diferentes proteínas en la mezcla tienen diferente afinidad por la matriz, se retardan en distintos grados. A medida que el disolvente pasa a través de la columna y gotea por el fondo, se recoge como *fracciones* en una serie de tubos. Esas proteínas en la mezcla con menor afinidad por la columna aparecen en las primeras fracciones que emergen de la misma. La resolución de muchos procedimientos cromatográficos se ha mejorado con el desarrollo de la *cromatografía líquida de alto rendimiento* (*HPLC*, *high performance liquid chromatography*), en la que se utilizan columnas largas y estrechas, y la fase móvil es forzada a alta presión a través de una matriz no compresible, muy compacta, compuesta de partículas excepcionalmente pequeñas (por ejemplo, 5 μm de diámetro).

[3] La cromatografía líquida se distingue de la cromatografía gaseosa en la cual la fase móvil está representada por un gas inerte.

### Cromatografía de intercambio iónico

Las proteínas son electrólitos polivalentes grandes y es poco probable que muchas de ellas en una preparación parcialmente purificada tengan la misma carga general. La carga global de una proteína es una suma de todas las cargas individuales de sus aminoácidos componentes. Debido a que la carga de cada aminoácido depende del pH del medio (véase figura 2.27), la carga de cada proteína también depende del pH. A medida que disminuye el pH, los grupos con carga negativa se neutralizan y los grupos con carga positiva se vuelven más numerosos. Ocurre lo contrario a medida que aumenta el pH. Existe un pH para cada proteína en el que el número total de cargas negativas es igual al número total de cargas positivas. Este pH es el **punto isoeléctrico**, en el que la proteína es neutra. El punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas está por debajo de pH 7.

La carga iónica se usa como base para la purificación en una variedad de técnicas, incluida la **cromatografía de intercambio iónico**. La cromatografía de intercambio iónico depende de la unión iónica de las proteínas a un material inerte de la matriz, como la celulosa, que contiene grupos cargados unidos covalentemente. Dos de las resinas de intercambio iónico más comúnmente empleadas son la dietilaminoetil (DEAE, *diethylaminoethyl*) celulosa y la carboximetil (CM, *carboxymethyl*) celulosa. La DEAE-celulosa está cargada positivamente y por tanto se une a las moléculas cargadas negativamente; es un *intercambiador de aniones*. La CM celulosa está cargada en modo negativo y actúa como un *intercambiador de cationes*. La resina se adiciona a una columna, y la solución de proteínas se deja filtrar a través de la columna en un tampón cuya composición promueve la unión de algunas o todas las proteínas a la resina. Las proteínas se unen a la resina de manera reversible y se pueden desplazar al aumentar la fuerza iónica del tampón (que agrega iones pequeños para competir con los grupos cargados de las macromoléculas por los sitios en la resina) y/o cambiando su pH. Las proteínas se eluyen de la columna en orden desde la menos fuertemente unida a la más unida. La **FIGURA 18-26** muestra una representación esquemática de la separación de dos especies de proteínas mediante elución gradual en una columna de intercambio de iones.

### Cromatografía de filtración en gel

La **filtración en gel** separa las proteínas (o los ácidos nucleicos) principalmente en función de su tamaño efectivo (*radio hidrodinámico*). Al igual que la cromatografía de intercambio de iones, el material de separación consiste en pequeñas perlas que se empaquetan en una columna a través de la cual la solución de proteína pasa lentamente. Los materiales utilizados en la filtración en gel están compuestos por polisacáridos reticulados (dextranos o agarosa) de diferente porosidad, que permiten que las proteínas se difundan dentro y fuera de las perlas. La técnica se ilustra mejor con el ejemplo (**FIGURA 18-27**).

Supongamos que uno está tratando de purificar una proteína globular que tiene una masa molecular de 125 000 dalton. Esta

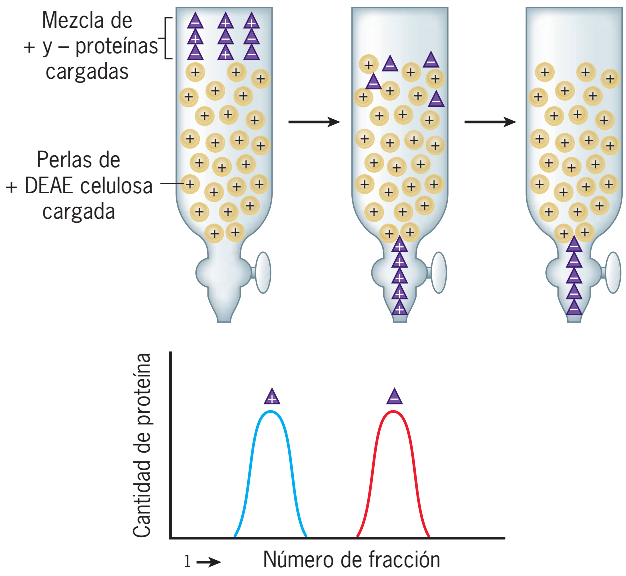



**FIGURA 18-26 Cromatografía de intercambio iónico.** La separación de dos proteínas por la DEAE celulosa. En este caso, se utiliza una resina de intercambio iónico cargada positivamente para unir la proteína cargada negativamente.

proteína está presente en solución con dos proteínas contaminantes de forma similar, una mucho más grande con 250 000 dalton y la otra mucho más pequeña con 75 000 dalton. Una forma en que la proteína podría ser purificada es pasar la mezcla a través de una columna de cuentas de Sefadex G-150, que permite la entrada a las proteínas globulares menores de aproximadamente 200 kDa. Cuando la mezcla de proteínas pasa a través del lecho de la columna, la proteína de 250 kDa no puede entrar en las perlas y permanece disuelta en la fase del disolvente en movimiento. Como resultado, la proteína de 250 kDa se eluye tan pronto como el solvente preexistente en la columna (el volumen del lecho) ha goteado. En contraste, las otras dos proteínas pueden difundirse en los intersticios dentro de las perlas y se retrasan en su paso a través de la columna. A medida que más y más solventes se mueven a través de esta, estas proteínas se dirigen hacia abajo en su longitud y hacia la parte inferior, pero lo hacen a diferentes velocidades. Entre las proteínas que entran en las perlas, las especies más pequeñas se retardan en mayor medida que las más grandes. En consecuencia, la proteína de 125 kDa se eluye en estado purificado, mientras que la proteína de 75 kDa permanece en la columna.

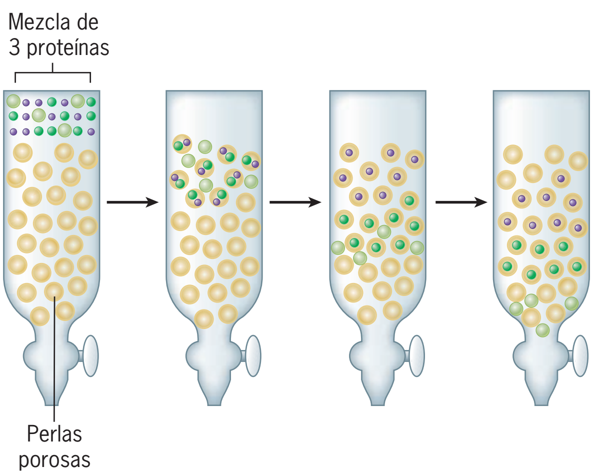



**FIGURA 18-27 Cromatografía de filtración en gel.** La separación de tres proteínas globulares que tienen diferente masa molecular, como se describe en el texto. Entre las proteínas de forma básica similar, las moléculas más grandes se eluyen antes que las moléculas más pequeñas.

## Cromatografía de afinidad

Las técnicas descritas hasta este momento utilizan las propiedades globales de una proteína para efectuar la purificación o el fraccionamiento. Otra técnica de purificación llamada **cromatografía de afinidad** aprovecha las propiedades estructurales únicas de una proteína, lo que permite que una especie de proteína se retire de la solución mientras que todas las demás permanecen en esta (figura 18-28). Las proteínas interactúan con sustancias específicas: enzimas con sustratos, receptores con ligandos, antígenos con anticuerpos, etc. Cada uno de estos tipos de proteínas se puede eliminar de la solución pasando una mezcla de proteínas a través de una columna en la que la molécula interactiva específica (sustrato, ligando, anticuerpo, etc.) está unida covalentemente a un material inerte e inmovilizado (la matriz, figura 18-28*a*). Si, por ejemplo, se pasa una preparación impura de un receptor de acetilcolina a través de una columna que contiene perlas de agarosa a la que se une un análogo de acetilcolina, el receptor se une a las perlas siempre que las condiciones de la columna sean adecuadas para promover la interacción (página 148). Una vez que todas las proteínas contaminantes han pasado a través de la columna y salen por la parte inferior, las moléculas receptoras de acetilcolina pueden desplazarse de sus sitios de unión en la matriz cambiando la composición iónica y/o el pH del solvente en la columna. Por tanto, a diferencia de los otros procedimientos cromatográficos que separan proteínas en función del tamaño o la carga, la cromatografía de afinidad puede lograr una purificación casi total de la molécula deseada en un solo paso. En los últimos años, la cromatografía de afinidad se ha utilizado con frecuencia para purificar proteínas modificadas genéticamente a fin de incluir una "marca" para una proteína específica, en su N o C terminal. Las marcas comunes incluyen las TAP (tratadas en la sección 2.15), las glutatión-S-transferasa (GST, *glutathione-S-transferase*) o una marca His (compuesta de una cadena de seis histidinas). Las proteínas marcadas con His se purifican utilizando una resina sobre la que se han inmovilizado iones de níquel, mientras que las proteínas marcadas con GST se purifican en función de su afinidad por la resina inmovilizada con glutatión.

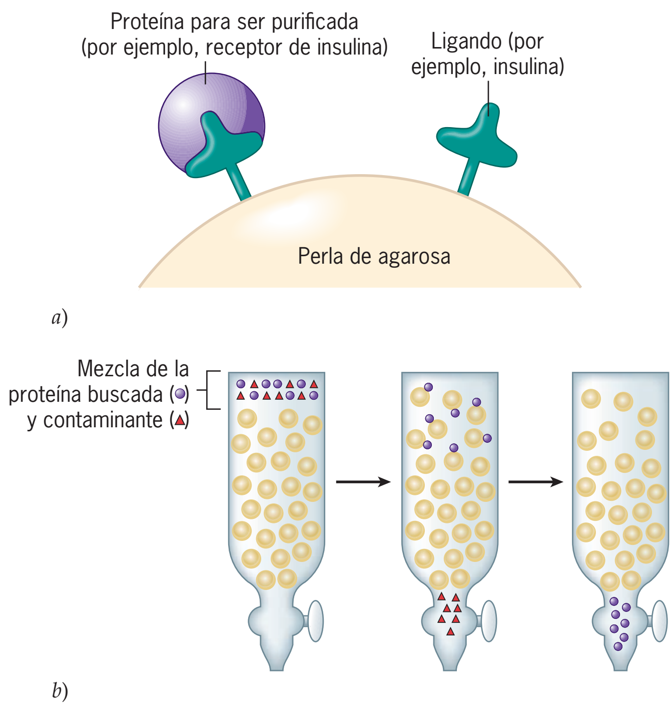



**FIGURA 18-28 Cromatografía de afinidad.** *a*) Representación esquemática de las perlas de agarosa recubiertas a las que sólo se puede combinar una proteína específica. *b*) Pasos en el procedimiento cromatográfico.

# 18.12 Determinación de proteínas: interacciones de las proteínas



Una de las formas de aprender acerca de la función de una proteína es identificar aquellas otras con las que interactúa. Hay varias técnicas disponibles para determinar qué proteínas en una célula podrían ser capaces de interactuar con una proteína que ya ha sido identificada. Una de estas técnicas fue discutida: la cromatografía de afinidad. Otra técnica utiliza anticuerpos. Considere, por ejemplo, que la proteína A, ya identificada y purificada, es parte de un complejo con otras dos proteínas en el citoplasma, las proteínas B y C. Una vez que la proteína A se ha purificado, se puede obtener un anticuerpo contra esta y se utiliza como una sonda para unir y eliminar la proteína A de la solución. Si se prepara un extracto celular que contiene el complejo proteico A-B-C, y el extracto se incuba con el anticuerpo anti-A, entonces la unión del anticuerpo a la proteína A dará como resultado la coprecipitación de las otras proteínas que están unidas a A, en este caso las proteínas B y C, que luego pueden ser identificadas. La coprecipitación de fragmentos del DNA mediante la técnica ChIP se ilustró en la figura 12.46.

Una técnica que se ha utilizado ampliamente para buscar interacciones proteína-proteína es el *sistema de levadura de dos híbridos*, que fue inventado en 1989 por Stanley Fields y Ok-kyu Song en la Universidad Estatal de Nueva York en Stony Brook. La técnica se ilustra en la **FIGURA 18-29** y depende de la expresión de un gen indicador, como la β galactosidasa (*lacZ*), cuya actividad se controla fácilmente mediante una prueba que detecta un cambio de color cuando la enzima está presente en una población de células de levadura. La expresión del gen *lacZ* en este sistema se activa mediante una proteína en particular, un factor de transcripción, que contiene dos dominios, uno de unión al DNA y otro de activación (figura 18-29*a*). El dominio de unión al DNA media la unión al promotor, y el dominio de activación media la interacción con otras proteínas involucradas en la activación de la expresión génica. Ambos dominios deben estar presentes para que ocurra la transcripción. Para emplear la técnica, se preparan dos tipos diferentes de moléculas de DNA recombinante. Una molécula de DNA contiene un segmento del DNA que codifica el dominio de unión a DNA del factor de transcripción vinculado a un segmento de DNA que codifica la proteína “cebo” (X). La proteína cebo es la proteína que se ha caracterizado y la que se está buscando para posibles parejas de unión. Cuando este DNA recombinante se expresa en una célula de levadura, se produce en la célula una proteína híbrida como la que se muestra en la figura 18-29*b*). La otra molécula de DNA contiene una parte del factor de transcripción que codifica el dominio de activación vinculado al DNA que codifica una proteína desconocida (Y). Dichos DNA (o cDNA como se les llama) se preparan a partir del mRNA por la transcriptasa inversa como se describe en la página 731. Supongamos que Y es una proteína capaz de unirse a la proteína cebo. Cuando un DNA recombinante que codifica Y se expresa en una célula de levadura, se produce en la célula una proteína híbrida como la que se muestra en la figura 18-29*c*). Cuando se produce en una célula sola, ninguna de las proteínas híbridas que contiene X, ni Y, es capaz de activar la transcripción del gen *lacZ* (figura 18-29 *b*, *c*). Sin embargo, si estas dos moléculas de DNA recombinante en particular se introducen en la misma célula de levadura (como en la figura 18-29*d*), las proteínas X e Y pueden interactuar entre sí para reconstituir un factor de transcripción funcional, un evento que puede ser detectado por la capacidad de la célula para producir β galactosidasa. Usando esta técnica, los investigadores pueden “pescar” proteínas codificadas por genes desconocidos que son capaces de interactuar con la proteína “cebo”. La metodología Y2H es particularmente muy adecuada para detectar grandes cantidades de proteínas y su uso en estudios proteómicos a gran escala (alto rendimiento) lo que se discute en la sección 2.15. En los últimos años, el enfoque de dos híbridos, pionero en las levaduras, se ha adaptado para su uso en las células de los mamíferos. Hasta la fecha, los estudios que utilizan sistemas de dos híbridos tienden

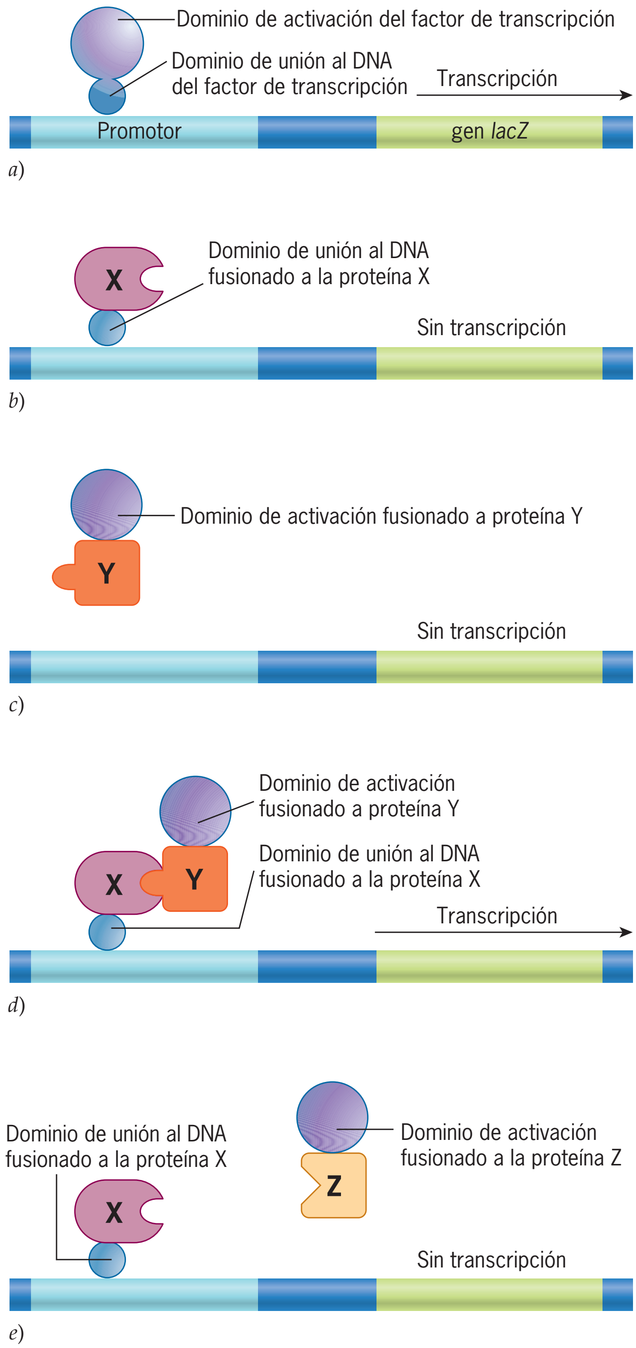



**FIGURA 18-29 Uso del sistema de levadura de dos híbridos.** Esta prueba para la interacción proteína-proteína depende de que una célula pueda juntar dos partes de un factor de transcripción. *a*) Las dos partes del factor de transcripción, el dominio de unión al DNA y el dominio de activación, se ven aquí cuando el factor de transcripción se une al promotor de un gen (*lacZ*) que codifica la β galactosidasa. *b*) En este caso, una célula de levadura ha sintetizado el dominio de unión al DNA del factor de transcripción vinculado a una proteína X conocida como “cebo”. Este complejo no puede activar la transcripción. *c*) En este caso, una célula de levadura ha sintetizado el dominio de activación del factor de transcripción vinculado a una proteína Y desconocida, “pez”. Este complejo no puede activar la transcripción. *d*) En este caso, una célula de levadura ha sintetizado las construcciones de las proteínas X e Y, que reconstituyen un factor de transcripción completo, permitiendo la expresión de *lacZ*, que se detecta fácilmente. *e*) Si el segundo DNA hubiera codificado una proteína, por ejemplo, Z, que no pudiera unirse a X, no se habría detectado ninguna expresión del gen informador.

a centrarse más en las interacciones de proteínas específicas que en la determinación de bibliotecas de proteínas a gran escala.

## 18.13 Caracterización de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Otra técnica poderosa que se usa ampliamente para separar proteínas es la **electroforesis**. La electroforesis depende de la capacidad de las moléculas cargadas para migrar cuando se colocan en un campo eléctrico. La separación electroforética de proteínas generalmente se realiza mediante **electroforesis en gel de poliacrilamida** (**PAGE**, *polyacrylamide gel electrophoresis*), en la que las proteínas son impulsadas por una corriente aplicada a través de una matriz gelificada. La matriz está compuesta de polímeros de una pequeña molécula orgánica (acrilamida) que está reticulada para formar un tamiz molecular. Un gel de poliacrilamida se puede formar como una placa delgada entre dos placas de vidrio o como un cilindro dentro de un tubo de vidrio. Una vez que el gel se ha polimerizado, la placa (o tubo) se suspende entre dos compartimientos que contienen tampón en el que se sumergen los electrodos opuestos. En un gel de placa, la muestra concentrada que contiene las proteínas se coloca en capas a lo largo de la parte superior del gel, como se muestra en el paso 1 de la **FIGURA 18-30**. La proteína simple se prepara en una solución que contiene sacarosa o glicerol, cuya densidad evita que la muestra se mezcle con el tampón en el compartimiento superior. Luego, se aplica un voltaje entre los compartimientos del tampón y la corriente fluye a través de la placa, lo que hace que las proteínas se muevan hacia el electrodo cargado de manera opuesta (paso 2). Las separaciones se llevan a cabo utilizando tampones alcalinos, que hacen que las proteínas se carguen negativamente y emigren hacia el ánodo cargado positivamente en el extremo opuesto del gel. Después de la electroforesis, la placa se retira de las de vidrio y se tiñe (paso 3).

El movimiento relativo de las proteínas a través de un gel de poliacrilamida depende de la *densidad de carga* (carga por unidad de masa) de las moléculas. Cuanto mayor es la densidad de la carga, más fuertemente se impulsa la proteína a través del gel y, por tanto, más rápida es su tasa de migración. Pero la densidad de la carga es sólo un factor importante en el fraccionamiento del PAGE; el tamaño y la forma también juegan un papel. La poliacrilamida forma un tamiz molecular reticulado que enreda las proteínas que pasan a través del gel. Cuanto más grande es la proteína, más se enreda y más lentamente emigra. La forma también es un factor porque las proteínas globulares compactas se mueven más rápidamente que las proteínas fibrosas alargadas de masa molecular comparable. La concentración de acrilamida (y el agente de reticulación) utilizada en la fabricación del gel también es un factor importante. Cuanto más baja es la concentración de la acrilamida, menos se enlaza el gel y más rápidamente migra una molécula de proteína dada. Un gel que contiene 5% de acrilamida podría ser útil para separar proteínas de 60 a 250 kDa, mientras que un gel de 15% de acrilamida podría ser útil para separar proteínas de 10 a 50 kDa.

En el progreso de la electroforesis se sigue observando la migración de un *colorante de seguimiento* cargado que se mueve justo por delante de las proteínas más rápidas (paso 2, figura 18-30). Después de que el tinte de rastreo se haya movido a la ubicación deseada, la corriente se apaga y el gel se retira de su recipiente. Los geles se tiñen típicamente con azul de Coomassie o con tinción de plata para revelar las ubicaciones de las proteínas. Si estas están marcadas radiactivamente, sus ubicaciones pueden ser determinadas presionando el gel contra un pedazo de película de rayos X para producir una autorradiografía, o el gel se puede cortar en fracciones y aislar las proteínas individuales. Alternativamente, las proteínas en el gel pueden transferirse mediante un segundo procedimiento electroforético a una membrana de nitrocelulosa para formar una mancha (página 722). Las proteínas se absorben en la superficie de la membrana en las mismas posiciones relativas que ocupaban en el gel. En un examen de inmuno-

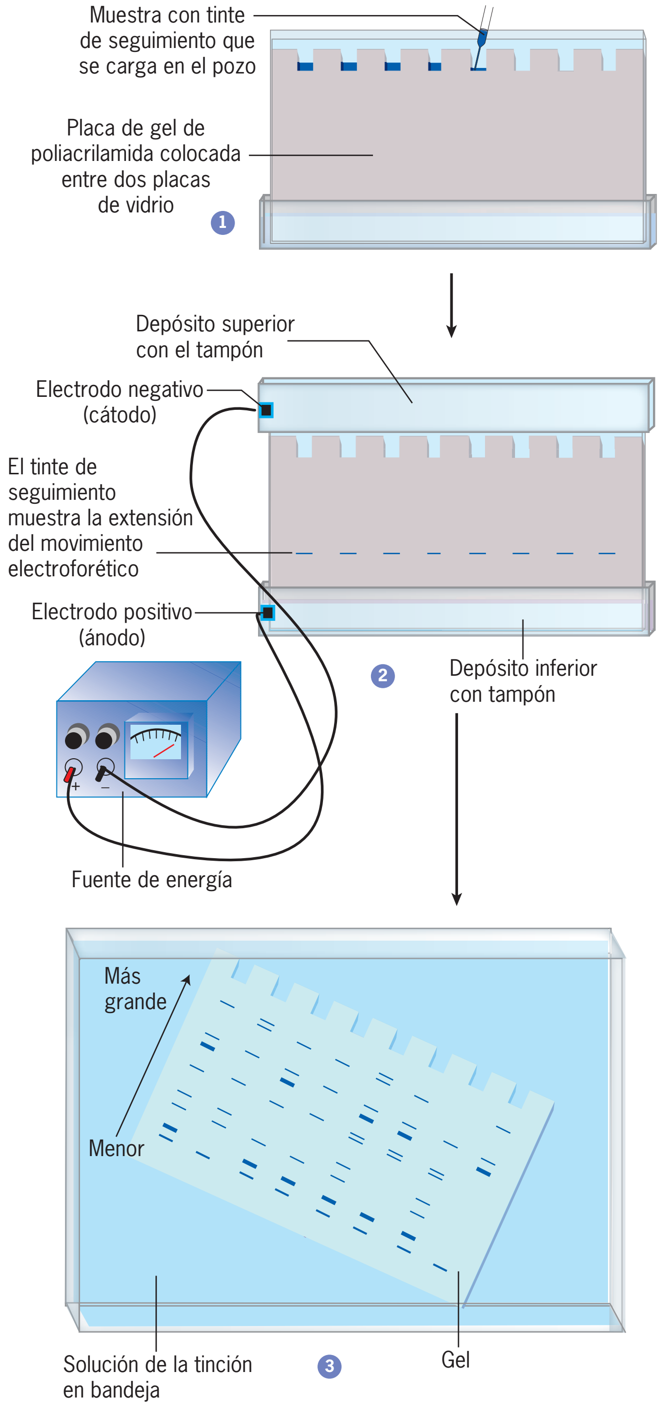



**FIGURA 18-30 Electroforesis en gel de poliacrilamida.** Las muestras de las proteínas se disuelven en una solución de sacarosa cuya densidad evita que la muestra se mezcle con el tampón y luego se cargan en los pocillos con una pipeta fina como se muestra en el paso 1. En el paso 2, se aplica una corriente directa a través del gel, que hace que las proteínas se muevan hacia la poliacrilamida a lo largo de los carriles paralelos. Cuando se lleva a cabo en el detergente SDS, que suele ser el caso, las proteínas se mueven como bandas a velocidades que son inversamente proporcionales a su masa molecular. Una vez que se completa la electroforesis, el gel se retira del marco de vidrio y se tiñe en una bandeja (paso 3).

transferencia, las proteínas en la membrana se identifican por su interacción con los anticuerpos específicos.

### SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) por lo general se hace en presencia de detergente cargado negativamente dodecil sulfato de sodio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*), que se une en grandes cantidades a todos los tipos de moléculas de proteínas (página 126). La repulsión electrostática entre las moléculas de SDS unidas hace que las proteínas se desplieguen de forma similar a una barra, eliminando así las diferencias en la forma como un factor de la separación. El número de moléculas de SDS que se unen a una proteína es casi proporcional a la masa molecular de la proteína (aproximadamente 1.4 g de SDS/g de proteína). En consecuencia, cada especie de proteína, con independencia de su tamaño, tiene una densidad de carga equivalente y se conduce a través del gel con la misma fuerza. Sin embargo, debido a que la poliacrilamida está altamente reticulada, las proteínas más grandes se mantienen más que las pequeñas. Como resultado, las proteínas se separan por SDS-PAGE sobre la base de una sola propiedad: su masa molecular. Además de separar las proteínas en una mezcla, SDS-PAGE se puede usar para determinar la masa molecular de las diversas proteínas comparando las posiciones de las bandas con las producidas por proteínas de tamaño conocido. Los ejemplos de SDS-PAGE se muestran en la figura 4-32*c*) y en la página 149.

### Electroforesis en gel bidimensional

En 1975, una técnica llamada *electroforesis en gel bidimensional* fue desarrollada por Patrick O'Farrell en la Universidad de California en San Francisco, para separar mezclas complejas de proteínas utilizando dos propiedades diferentes de las moléculas. Las proteínas se separan primero en un gel tubular según su punto isoeléctrico (página 712) mediante una técnica llamada *enfoque isoeléctrico*. Después de la separación, el gel se retira y se coloca encima de una placa de poliacrilamida saturada con SDS y sujeto a SDS-PAGE. Las proteínas se mueven hacia el gel de la placa y se separan de acuerdo con su masa molecular (**FIGURA 18-31**). Una vez separadas, es posible eliminar del gel las proteínas individuales y digerirlas en fragmentos de péptidos que se pueden analizar por espectrometría de masas. La resolución de la técnica es suficientemente alta para distinguir la mayoría de las proteínas en una célula. Debido a su gran poder de resolución, la electroforesis en gel bidimensional es ideal para detectar cambios en las proteínas presentes en una célula en diferentes condiciones, en distintas etapas del desarrollo o en el ciclo celular, o en diferentes organismos. Sin embargo, la técnica no es adecuada para distinguir entre proteínas que tienen una masa molecular elevada, que son altamente hidrófobas, o que están presentes en muy bajos números de copia por célula.

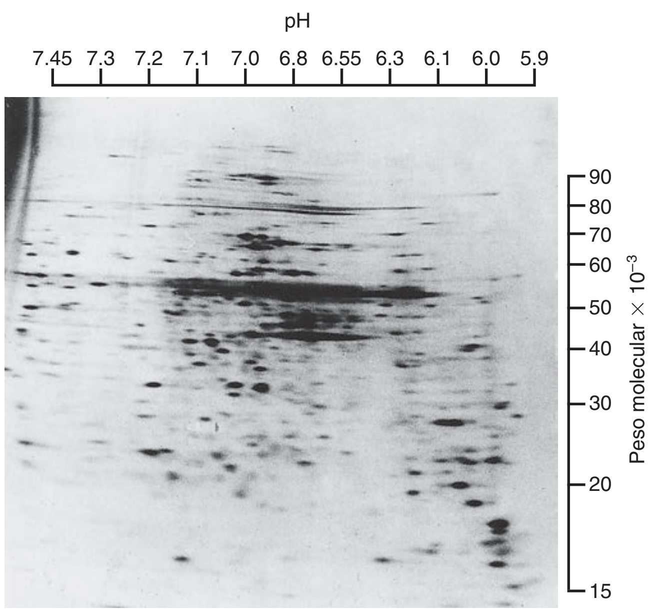



**FIGURA 18-31 Electroforesis en gel bidimensional.** Un gel de poliacrilamida bidimensional de proteínas cromosómicas sin histona de células HeLa marcadas con [$^{35}$S] metionina. Más de mil proteínas diferentes se pueden resolver con esta técnica.

FUENTE: De J. L. Peterson y E. H. McConkey, J. Biol. Chem. 251:550, 1976. © 1976 the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

## 18.14 Caracterización de las proteínas por espectrometría

Uno de los métodos más simples y utilizados para determinar la cantidad de proteína (o ácido nucleico) presente en una solución dada es medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica que es absorbida por esa solución. El instrumento utilizado para esta medición es un **espectrofotómetro**, y para realizarla se coloca la solución en un recipiente especial de cuarzo de superficie plana (el cuarzo se usa porque, a diferencia del vidrio, no absorbe la luz ultravioleta), denominada cubeta, que luego se coloca en el haz de luz del espectrofotómetro. La cantidad de luz que pasa a través de la solución no absorbida (es decir, la luz transmitida) se mide mediante fotocélulas en el otro lado de la cubeta.

De los 20 aminoácidos incorporados en las proteínas, dos de ellos, la tirosina y la fenilalanina, absorben la luz en el rango ultravioleta con un máximo de absorbancia de aproximadamente 280 nm. Si las proteínas en estudio tienen un porcentaje típico de estos aminoácidos, entonces la absorbancia de la solución en esta longitud de onda proporciona una medida de la concentración de la proteína.

Alternativamente, se puede usar una variedad de ensayos químicos, como la técnica de Lowry o Biuret, en la que la proteína en solución participa en una reacción que produce un producto coloreado cuya concentración es proporcional a la concentración de proteína.

## 18.15 Caracterización de las proteínas mediante espectrometría de masas

Como se discutió en la sección 2.15, el campo emergente de la proteómica depende en gran medida del análisis de las proteínas por *espectrometría de masas*. Los espectrómetros de masas son instrumentos analíticos utilizados principalmente para medir la masa de las moléculas, determinar las fórmulas químicas y las estructuras moleculares e identificar las sustancias desconocidas. Los espectrómetros de masas logran estas proezas convirtiendo las sustancias de una muestra en iones gaseosos cargados positivamente, que se aceleran a través de un tubo curvo hacia una placa cargada negativamente (**FIGURA 18-32**). A medida que los iones pasan a través del tubo, son sometidos a un campo magnético que hace que se separen entre sí de acuerdo con su masa molecular [o, más precisamente, de acuerdo con su relación masa-a-carga (m/z)]. Los iones golpean un detector electrónico ubicado en el extremo del tubo. Los iones más pequeños viajan más rápido y golpean el detector más rápidamente que los iones más grandes. La entrada al detector se convierte en una serie de picos de la proporción *m/z* ascendente (como indica la figura 2.47).

Los espectrómetros de masas han sido un instrumento favorito de los químicos durante muchos años, pero sólo en las últimas dos décadas los biólogos han descubierto sus notables poderes

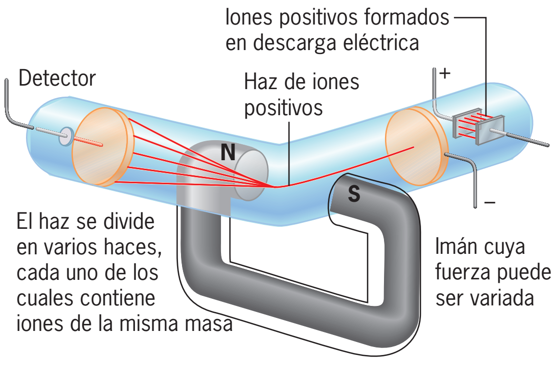



**FIGURA 18-32 Principios de funcionamiento de un espectrómetro de masas.**

FUENTE: De J. E. Brady, J. Russell, y J. R. Holum, Chemistry, 3d ed.; copyright © 2000, John Wiley and Sons, Inc. Reimpreso con permiso de John Wiley and Sons, Inc.

analíticos. Ahora, utilizando la espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), los bioquímicos de proteínas pueden identificar rápidamente las proteínas presentes en un tipo particular de célula, orgánulo o complejo de proteínas. Para llevar a cabo este análisis, la muestra de proteína generalmente se digiere con tripsina, se fracciona por cromatografía líquida y los péptidos se introducen en un espectrómetro de masas donde se ionizan suavemente y se hacen gaseosos mediante uno de dos procedimientos. El desarrollo de estas técnicas de ionización de péptidos ha sido la clave para adaptar la MS al estudio de las proteínas. En un procedimiento, llamado *ionización por desorción con láser asistida por matriz* (*MALDI*, *matrix-assisted laser desorption ionization*), la muestra de proteína se aplica como parte de una matriz cristalina, que se irradia mediante un pulso de láser. La energía del láser excita la matriz y la energía absorbida convierte los péptidos en iones gaseosos. En un procedimiento alternativo, llamado *ionización por electropulverización* (*ESI*, *electrospray ionization*), se aplica un potencial eléctrico a una solución peptídica, lo cual hace que los péptidos se ionicen y el líquido se pulverice como una fina niebla de partículas cargadas que ingresan al espectrómetro. Debido a que actúa sobre las moléculas en solución, ESI está bien adaptada para ionizar péptidos preparados a partir de las proteínas fraccionadas por una técnica de cromatografía líquida ampliamente empleada.

Una vez que se han determinado las masas moleculares de los péptidos en la muestra, las proteínas pueden identificarse mediante una búsqueda en la base de datos como se describe en la sección 2.15. Si cada una de las proteínas no puede identificarse de manera inequívoca, uno o más de los péptidos generados por la digestión tríptica pueden fragmentarse[4] en un segundo paso y someterse a otra ronda de espectrometría de masas. Este procedimiento de dos pasos (llamado MS en tándem o MS/MS) produce la secuencia de aminoácidos de los péptidos, que luego se pueden ensamblar en el conjunto de proteínas de las que se derivan. La MS/MS es tan poderosa que las mezclas complejas de cientos de proteínas desconocidas pueden digerirse y someterse a espectrometría de masas y determinar la identidad de cada una de las proteínas en la mezcla. MS/MS también se puede utilizar para identificar las modificaciones específicas después de la traducción que están presentes en una proteína particular bajo un conjunto específico de condiciones fisiológicas.

[4] La fragmentación se realiza dentro del espectrómetro de masas por colisión de los péptidos con un gas inerte. La energía de colisión rompe los enlaces peptídicos para producir una colección aleatoria de fragmentos del péptido original. La secuencia de aminoácidos de cada fragmento, y por tanto la del péptido original, se puede determinar buscando en una base de datos que contiene las masas de los fragmentos teóricos que tienen todas las posibles secuencias de los aminoácidos que pueden formarse a partir de las proteínas codificadas por ese genoma.

## 18.16 Determinación de la estructura de las proteínas y los complejos multisubunitarios

La **cristalografía de rayos X** (o difracción de rayos X) utiliza los cristales de las proteínas, que se bombardean con un haz fino de rayos X (**FIGURA 18-33**). La radiación que es dispersada (difractada) por los electrones de los átomos de la proteína golpea un detector sensible a los electrones colocado detrás del cristal. El patrón de difracción producido por un cristal está determinado por la estructura dentro de la proteína; la gran cantidad de moléculas en el cristal refuerza los reflejos, haciendo que se comporte como si fuera una molécula gigante. Las posiciones e intensidades de los reflejos, como las de la placa fotográfica de la figura 2.33, pueden relacionarse matemáticamente con las densidades de los electrones dentro de la proteína, porque son los electrones de los átomos los que los produjeron. La resolución obtenida por la difracción de rayos X depende del número de puntos que se analizan.

La mioglobina fue la primera proteína cuya estructura se determinó por difracción de rayos X. La proteína se analizó sucesivamente a 6, 2 y 1.4 Å, con años transcurridos entre cada determinación completa. Teniendo en cuenta que los enlaces covalentes tienen una longitud de entre 1 y 1.5 Å y los enlaces no covalentes de entre 2.8 y 4 Å, la información recopilada para una proteína depende de la resolución obtenida. Esto se ilustra mediante una comparación de la densidad electrónica de una molécula orgánica pequeña en cuatro niveles de resolución (**FIGURA 18-34**). En la mioglobina, una resolución de 6 Å fue suficiente para mostrar la manera en que se pliega la cadena polipeptídica y la ubicación del resto hemo, pero no fue suficiente para mostrar la estructura dentro de la cadena. A una resolución de 2 Å, los grupos de átomos podrían estar separados unos de otros, mientras que a 1.4 Å, se determinaron las posiciones de los átomos individuales. Hasta la fecha, las estructuras de varios cientos de proteínas se han determinado con una resolución atómica <1.2 Å y unas pocas tan bajas como 0.66 Å.

A lo largo de los años, la tecnología de difracción de rayos X ha mejorado mucho. Max Perutz tardó 22 años en resolver la estructura de la hemoglobina (figura 2.40*b*), una tarea que hoy podría llevar algunas semanas. En la mayoría de los estudios actuales: 1) los sincrotrones generan haz de rayos X intensos y altamente enfocados (consúltese la página 96), que son aceleradores de partículas de alta energía que producen rayos X como producto secundario, y 2) los detectores electrónicos altamente sensibles (dispositivos de carga acoplados o CCD) que proporcionan una lectura digital de los datos de difracción han reemplazado las placas fotográficas. El uso de estos instrumentos en conjunto con las

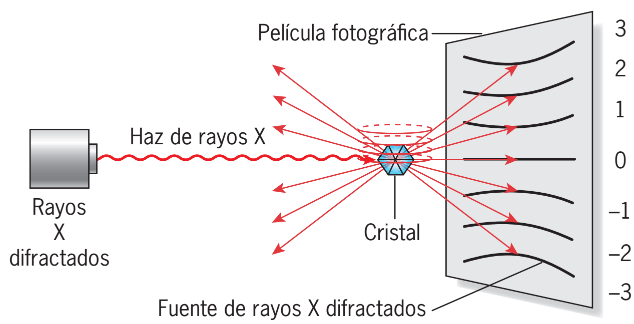
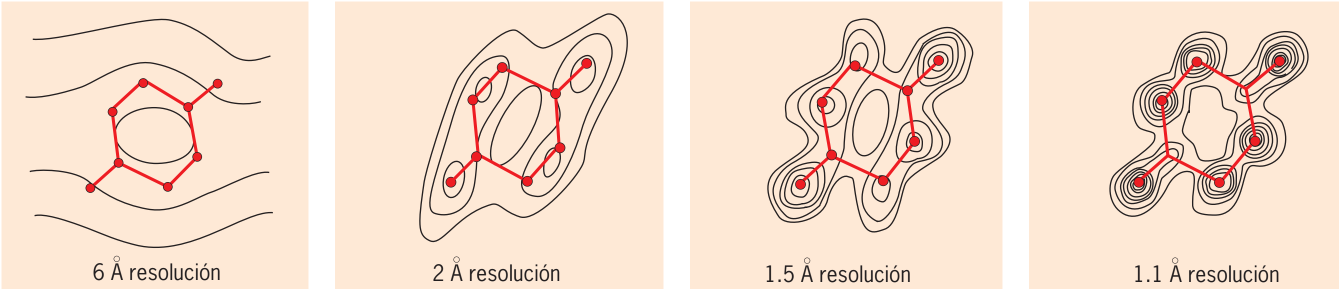



**FIGURA 18-33 Análisis de difracción de rayos X.** Diagrama esquemático de la difracción de rayos X por los átomos de un plano de un cristal en una placa fotográfica. El conjunto ordenado de los átomos dentro del cristal produce una serie repetitiva de ondas circulares superpuestas que se extienden y se intersectan con la película. Al igual que con la difracción de la luz visible, las ondas forman un patrón de interferencia, que se refuerzan entre sí en algunos puntos de la película y se cancelan entre sí en otros puntos.




*a*) *b*) *c*) *d*)

**FIGURA 18-34 Distribución de la densidad electrónica de una molécula orgánica pequeña (dicetopiperazina) calculada en varios niveles de resolución.** En la resolución más baja *a*), sólo se puede distinguir la naturaleza del anillo de la molécula, mientras que en la resolución más alta *d*), se revela la densidad electrónica alrededor de cada átomo (indicada por las líneas de contorno circular).

FUENTE: Después D. Hodgkin. Reproducido con permiso de Nature 188: 445, 1960; copyright 1960, Nature by Nature Publishing Group. Reproducido con permiso de Nature Publishing Group en el formato reutilizar en un libro/libro de texto via Copyright Clearance Center.

computadoras cada vez más potentes permiten a los investigadores recopilar y analizar datos suficientes para determinar la estructura terciaria de la mayoría de las proteínas en cuestión de horas. Como resultado de estos avances, la cristalografía de rayos X se ha aplicado al análisis de las estructuras moleculares cada vez más grandes. Probablemente, esto se ilustra mejor por el éxito alcanzado en la determinación de la estructura del ribosoma, que se analiza en el capítulo 11. En la mayoría de los casos, como ocurrió en el estudio del ribosoma, el mayor desafío en este campo es obtener cristales utilizables.

La cristalografía de rayos X es ideal para determinar la estructura de las proteínas solubles que se prestan a la cristalización, pero puede ser un gran desafío para el estudio de las estructuras complejas de varias unidades, como los ribosomas o los proteasomas, o para las proteínas de la membrana, donde es difícil obtener los cristales tridimensionales requeridos para el análisis. El análisis estructural de estos tipos de muestras a menudo se realiza utilizando una técnica alternativa que aprovecha el tremendo poder de resolución del microscopio electrónico y las técnicas de procesamiento de imágenes basadas en la computadora.

Hay dos enfoques generales para el estudio de partículas individuales con el microscopio electrónico. En un enfoque, las partículas se colocan en una rejilla del microscopio electrónico, se tiñen negativamente y luego se secan al aire (como se explica en la página 705). En el enfoque alternativo, que se conoce como *crio-microscopía electrónica o crio-EM*, las partículas se colocan en una rejilla en un estado hidratado y se congelan de forma rápida en nitrógeno líquido sin fijarse ni teñirse (**FIGURA 18-35**). Para estudios de mayor resolución, el uso de muestras teñidas negativamente ha sido reemplazado en gran medida por partículas congeladas e hidratadas, que tienen muchas menos probabilidades de generar artefactos y son mucho más adecuadas para el estudio de las características internas dentro de la estructura de la partícula. En cualquier caso, las rejillas se colocan en la columna del microscopio y se toman fotografías de las partículas. Cada fotografía es una imagen bidimensional de una partícula individual en la orientación en que se supone descansaba en la cuadrícula. Cuando las imágenes bidimensionales de decenas de miles de especímenes diferentes en cada orientación concebible se promedian mediante análisis computarizados de alta potencia, se puede generar una reconstrucción tridimensional de la partícula a una resolución de ~10 Å. En esta resolución, los investigadores pueden rastrear la cadena polipeptídica de una proteína e incluso identificar la ubicación de las cadenas laterales de los aminoácidos voluminosos. Un modelo de un ribosoma eucariótico basado en crio-EM se ilustra en la figura 2.57, un modelo de una vesícula recubierta de clatrina en la figura 8.40*c*, y un modelo de una partícula snRNP U1 en la figura 11.31. Esta técnica, conocida como **reconstrucción de partícula única**, también es útil para capturar imágenes de una estructura, como un ribosoma, en diferentes etapas durante un proceso dinámico, como la etapa de elongación en la síntesis de las proteínas. Utilizando este enfoque, se han revelado varios de los principales cambios conformacionales que se producen durante cada paso de la traducción.

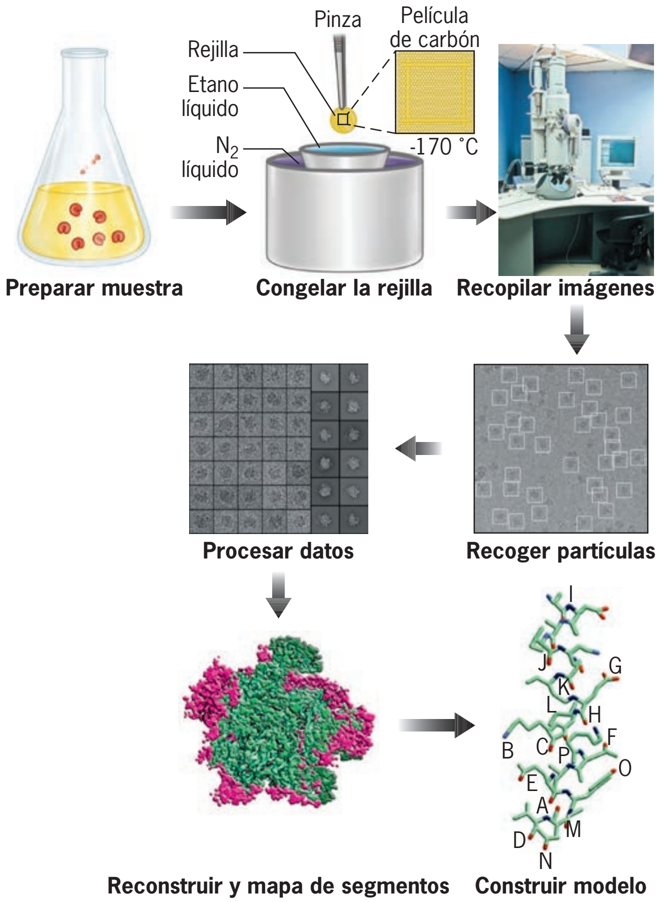



**FIGURA 18-35 Descripción general de la reconstrucción crio-EM de una sola partícula.** Después de preparar una muestra, se coloca un pequeño volumen de la muestra en una rejilla de carbón, que se seca suavemente para eliminar el exceso de líquido y se sumerge rápidamente en etano líquido. Las rejillas se ven a través de un microscopio electrónico de transmisión, preferiblemente equipado con un detector de electrones directo. De las imágenes obtenidas, muchos miles de partículas se seleccionan y colocan en las clases que pueden representar diferentes orientaciones o estados de las muestras. Los datos se procesan de forma computarizada, y se construye un mapa de densidad 3D, que revela la estructura de la proteína. Con los recientes avances en la tecnología y el software, las estructuras de nivel atómico se han resuelto utilizando crio-EM.

FUENTE: Zhang Laboratory. Fotos: Inga Spence/Science. Fuente de las imágenes; cortesía de Peter Shen y Adam Frost.

Además, las estructuras de resolución atómica determinadas por la cristalografía de rayos X pueden ajustarse en las reconstrucciones microscópicas electrónicas de resolución más baja para mostrar cómo interactúan las moléculas individuales que forman un complejo de múltiples subunidades y cómo pueden funcionar juntas para llevar a cabo una actividad particular. La **FIGURA 18-36** muestra la estructura terciaria de un filamento compuesto de actina y ADF (un miembro de la familia de las cofilinas, sección 9.13). Las estructuras de las dos proteínas se determinaron mediante estudios cristalográficos de rayos X separados y luego se ajustaron a un modelo microscópico electrónico de un filamento de actina-ADF. La reconstrucción mostrada en esta figura sirvió como base para un mecanismo propuesto por el cual las proteínas de la familia de las cofilinas pueden inducir el corte y la despolimerización de un filamento de actina (sección 9.10).

El análisis microscópico electrónico de muestras congeladas también se puede utilizar en el estudio de las proteínas de la membrana, como el receptor nicotínico de acetilcolina (consúltese la vía experimental para el capítulo 4). Este tipo de análisis requiere que las proteínas de la membrana estén empaquetadas a temperaturas muy bajas (por ejemplo, –195 °C) en matrices cristalinas bidimensionales dentro del plano de la membrana. Esta técnica ofrece una ventaja sobre los estudios cristalográficos de rayos X de las proteínas de la membrana, ya que estas permanecen durante todo el proceso dentro de su propia membrana natural en lugar de ser extraídas mediante detergente y cristalizada en un entorno no membranoso. Las estructuras ilustradas en la sección 4.12 se determinaron a partir de las imágenes combinadas, de alta resolución, con microscopía electrónica de muchas moléculas de proteínas diferentes tomadas en varios ángulos con respecto al haz de electrones. Esta técnica es conocida como *cristalografía electrónica*.



**FIGURA 18-36 La combinación de datos de la microscopía electrónica y la cristalografía de rayos X** proporciona información sobre las interacciones proteína-proteína y la estructura de los complejos multisubunitarios. La reconstrucción al microscopio electrónico de un filamento de actina-ADF se muestra en gris. Las estructuras cristalinas de rayos X de alta resolución de los monómeros de actina individuales (rojo) y las moléculas ADF (verde) se han incorporado en la estructura EM de resolución más baja.

FUENTE: Cortesía de Edward H. Egelman, University of Virginia, *J. Cell Biol*. 163: 1059, 2003 Fig. 2a. Reproducido con permiso de Rockefeller University Press.

Sólo en los últimos años, el desarrollo de un nuevo hardware de detección de electrones y de software de procesamiento de imagen ha dado lugar a la resolución de las estructuras de nivel casi atómico utilizando crio-EM. Con el avance continuo de la tecnología y la preparación de las muestras, los investigadores predicen que la técnica crio-EM pronto permitirá la resolución de estructuras de nivel atómico desde un número relativamente pequeño de imágenes.

## 18.17 Fraccionamiento de los ácidos nucleicos

Cualquier método de fraccionamiento sistemático debe explotar las diferencias entre los miembros de una mezcla para efectuar la separación. Las moléculas de ácido nucleico pueden diferir entre sí en tamaño general, composición de bases, topología y secuencia de nucleótidos. En consecuencia, los métodos de fraccionamiento para ácidos nucleicos se basan en estas características.

### Separación de DNA mediante electroforesis en gel

De las diversas técnicas utilizadas en el fraccionamiento de proteínas discutidas anteriormente, una de ellas, la electroforesis en gel, también se usa ampliamente para separar ácidos nucleicos de diferente masa molecular (es decir, longitud de los nucleótidos). Las moléculas pequeñas de RNA o DNA de unos pocos cientos de nucleótidos o menos generalmente son separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las moléculas más grandes tienen problemas para abrirse camino a través de la poliacrilamida reticulada y generalmente se fraccionan en geles de agarosa, que tienen una mayor porosidad. La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas; se disuelve en un tampón caliente, se vierte en un molde y se gelifica simplemente bajando la temperatura. La separación de las moléculas de DNA mayores de aproximadamente 25 kb se realiza generalmente usando la técnica de electroforesis de campo pulsado en la que la dirección del campo eléctrico en el gel cambia periódicamente, lo que hace que las moléculas de DNA se reorienten durante su migración (**FIGURA 18-37*a***).

Después de la electroforesis, los fragmentos de DNA en el gel se visualizan empapando el gel en una solución de una tinción tal como el bromuro de etidio. El bromuro de etidio se intercala en la doble hélice y hace que las bandas de DNA aparezcan fluorescentes cuando se observan bajo luz ultravioleta (figura 18-37*b*). La sensibilidad de la electroforesis en gel es tan grande que las moléculas de DNA o RNA que difieren en un solo nucleótido se pueden separar entre sí, una característica que dio lugar a un método invaluable para la secuenciación del DNA (sección 18.22). Debido a que la velocidad de migración a través de un gel también puede verse afectada por la forma de la molécula, la electroforesis se puede usar para separar moléculas con diferentes conformaciones, tales como circulares y lineales o distendidas y superenrolladas (consúltese la figura 10.13).

### Separación de ácidos nucleicos por ultracentrifugación

La experiencia común nos dice que la estabilidad de una solución (o suspensión) depende de sus componentes. La crema flota en la parte superior de la leche cruda, un fino precipitado se deposita gradualmente en el fondo de un recipiente y la solución de cloruro de sodio permanece estable de modo indefinido. Numerosos factores determinan si un componente dado se asentará a través de un medio líquido, incluido el tamaño, la forma y la densidad de la sustancia y la viscosidad del medio. Si un componente de una solución o suspensión es más denso que su medio, la fuerza cen-

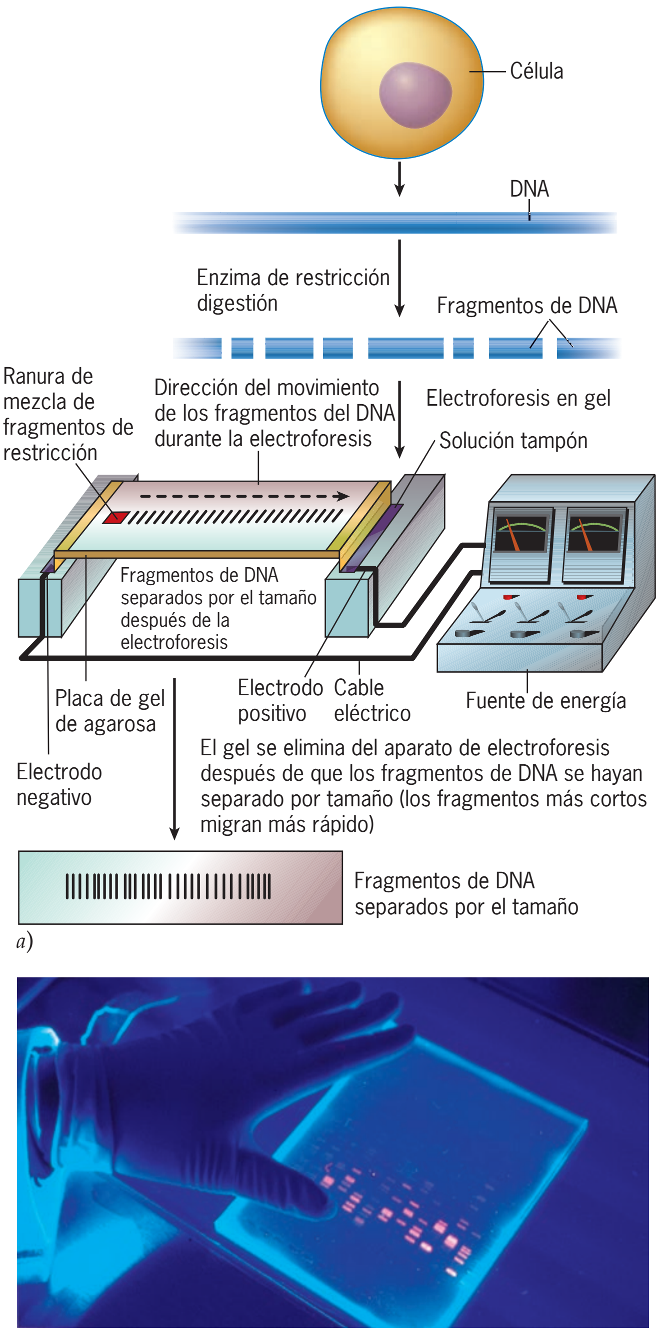



**FIGURA 18-37 Separación de fragmentos de restricción del DNA por electroforesis en gel.** *a*) El DNA se incuba con una enzima de restricción, que lo corta en fragmentos (página 723). La mezcla de fragmentos se introduce en una ranura, o bien, en una placa de agarosa y se aplica una corriente eléctrica. Las moléculas de DNA con carga negativa migran hacia el electrodo positivo y se separan por tamaño. *b*) Todos los fragmentos de DNA que están presentes en un gel pueden revelarse sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio y luego observándolo bajo una luz ultravioleta.

FUENTE: *b*) Phillipe Plailly/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.

trífuga hace que se concentre hacia el fondo de un tubo de centrífuga. Las partículas más grandes sedimentan más rápidamente que las pequeñas de forma y densidad similares. La tendencia de las moléculas a concentrarse durante la centrifugación se contrarresta con los efectos de la difusión, lo que hace que las moléculas se redistribuyan en una disposición más uniforme (aleatoria). Con el desarrollo de las ultracentrífugas, se ha vuelto posible generar fuerzas centrífugas mayores a 500 000 veces la fuerza de la gravedad, lo cual es suficiente para superar los efectos de la difusión y causar que las macromoléculas se sedimenten hacia el fondo de un tubo de centrífuga. La centrifugación se realiza cercana al vacío para minimizar la resistencia de la fricción. Las moléculas de DNA (y RNA) se han analizado con exhaustividad mediante técnicas que utilizan la ultracentrífuga. Con ese propósito, consideraremos dos técnicas de centrifugación utilizadas en los estudios de los ácidos nucleicos analizados en este texto. Estas técnicas se ilustran en la **FIGURA 18-38**.

**VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN** La velocidad a la que una molécula dada se mueve en respuesta a la fuerza centrífuga se conoce como su *velocidad de sedimentación*. Dado que la velocidad de sedimentación cambia junto con la fuerza centrífuga, una molécula dada se caracteriza por un coeficiente de sedimentación, que es su velocidad de sedimentación dividida por la fuerza. A lo largo de este libro, nos hemos referido a varias macromoléculas y sus complejos que tienen un valor S particular. La unidad S (o Svedberg, después del inventor de la ultracentrífuga) es equivalente a un coeficiente de sedimentación de $10^{-13}$ seg. Debido a que la velocidad con la que una partícula se mueve a través de una columna líquida depende de varios factores, incluida la forma, la determinación de los coeficientes de sedimentación no proporciona la masa molecular por sí sola. Sin embargo, siempre que se trate del mismo tipo de molécula, el valor S proporciona una buena medida del tamaño relativo. Por ejemplo, los tres RNA ribosomales de *E. coli*, las moléculas 5S, 16S y 23S, tienen longitudes de 120, 1 600 y 3 200 nucleótidos, respectivamente.

En la *velocidad* (*o tasa-zonal*) *de sedimentación*, las moléculas de ácido nucleico se separan de acuerdo con la longitud del nucleótido (figura 18-38*a*). La muestra que contiene la mezcla de moléculas de ácido nucleico se coloca cuidadosamente sobre una solución que contiene una concentración creciente de sacarosa (u otra sustancia adecuada). Este gradiente preformado aumenta en densidad (y viscosidad) de arriba a abajo. Cuando se las somete a altas fuerzas centrífugas, las moléculas se mueven a través del gradiente a una velocidad determinada por su coeficiente de sedimentación. Cuanto mayor es este coeficiente, más lejos se mueve una molécula en un periodo dado de centrifugación. Debido a que la densidad del medio es menor que la de las moléculas de ácido nucleico, incluso en la parte inferior del tubo (aproximadamente 1.2 g/mL para la solución de sacarosa y 1.7 g/mL para el ácido nucleico), estas moléculas continuan en el sedimento mientras el tubo esté centrifugado. En otras palabras, la centrifugación nunca alcanza el equilibrio. Después de un periodo prescrito, el tubo se retira de la centrífuga, sus contenidos se fraccionan (como se muestra en la figura 18-38*c*) y se determinan las posiciones relativas de las diversas moléculas. La presencia de la sacarosa viscosa evita que los contenidos del tubo se mezclen debido a la convección o al manejo, permitiendo que las moléculas de valor S idéntico permanezcan en su lugar en forma de una banda. Si hay moléculas marcadoras de coeficiente de sedimentación conocido, se pueden determinar los valores de S de los componentes desconocidos. Los resultados experimentales obtenidos por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se muestran en las figuras 11.11 y 11.15.

**CENTRIFUGACIÓN DE EQUILIBRIO** En otra técnica, la *centrifugación de equilibrio* (figura 18-38*b*), las moléculas de ácido nucleico se separan en función de su densidad de flotación. En este procedimiento, por lo general se emplea una solución altamente concentrada de la sal del metal pesado cesio. El análisis se inicia mezclando el DNA con la solución de cloruro de cesio o sulfato de cesio en el tubo de centrifugación y luego sometiendo el tubo a centrifugación extendida (por ejemplo, dos a tres días a altas fuerzas). Durante la centrifugación, los iones pesados de cesio se dirigen lentamente hacia la parte inferior del tubo, forman-

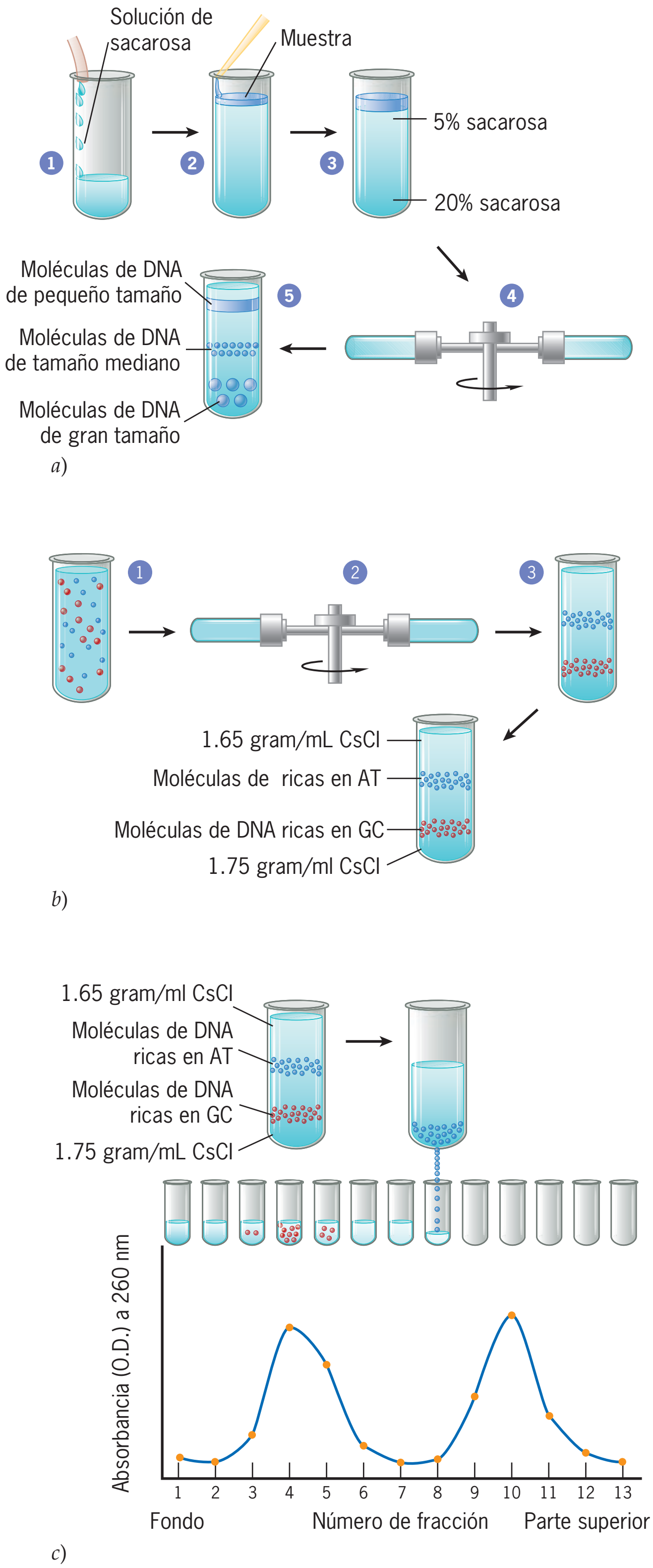



**FIGURA 18-38 Técnicas de sedimentación de los ácidos nucleicos.** *a*) Separación de las moléculas de DNA de diferentes tamaños por la velocidad de sedimentación. El gradiente de densidad de la sacarosa se forma dentro del tubo (paso 1) permitiendo que una solución de sacarosa de concentración creciente drene a lo largo de la pared del tubo. Una vez que se forma el gradiente, la muestra se coloca cuidadosamente sobre la parte superior del gradiente (pasos 2 y 3), y el tubo se somete a centrifugación (por ejemplo, 50 000 rpm durante 5 horas) como se ilustra en el paso 4. Las moléculas de DNA son separadas en función de su tamaño (paso 5). *b*) Separación de moléculas de DNA por sedimentación en equilibrio sobre la base de las diferencias en la composición de la base. La muestra de DNA se mezcla con la solución de CsCl (paso 1) y se somete a centrifugación prolongada (por ejemplo, 50 000 rpm durante 72 horas). El gradiente de CsCl se forma durante la centrifugación (paso 2) y la banda de moléculas de DNA en regiones de densidad equivalente (paso 3). *c*) El tubo del experimento de *b* se perfora y se permite que el contenido gotee en tubos sucesivos, fraccionando así el contenido del tubo. La absorbancia de la solución en cada fracción se mide y se representa como se muestra.

do un gradiente de densidad continuo a través de la columna de líquido. Después de un tiempo, la tendencia de los iones de cesio a concentrarse hacia la parte inferior del tubo se ve contrarrestada por la tendencia opuesta a redistribuirlos por difusión, y el gradiente se estabiliza. A medida que se va formando el gradiente de cesio, las moléculas de DNA individuales se impulsan hacia abajo o se mueven flotando hacia arriba en el tubo hasta que alcanzan una posición de una densidad de flotación equivalente a la suya, en cuyo punto ya no están sujetas a más movimientos. Las moléculas de densidad equivalente forman bandas estrechas dentro del tubo. Esta técnica es lo suficientemente sensible como para separar las moléculas de DNA que tienen una composición de base diferente (como se ilustra en la figura 18-38*b*) o que contienen diferentes isótopos de nitrógeno (15N *vs*. 14N, como se muestra en la figura 13.3*b*).

## 18.18 Hibridación del ácido nucleico

La **hibridación del ácido nucleico** incluye una variedad de técnicas relacionadas que se basan en la observación de que dos moléculas de ácido nucleico de cadena única de secuencia de base complementaria pueden formar un híbrido de doble cadena. Considere una situación en la que uno tiene una mezcla de cientos de fragmentos de DNA de idéntica longitud y una composición de base general que difieren entre sí únicamente en su secuencia de bases. Supongamos, por ejemplo, que uno de los fragmentos de DNA constituye una parte del gen de la β globina y todos los demás fragmentos contienen genes no relacionados. La única forma de distinguir entre el fragmento que codifica el polipéptido β globina y todos los demás es llevar a cabo un experimento de hibridación molecular utilizando moléculas complementarias como sondas.

En el presente ejemplo, la incubación de la mezcla de fragmentos de DNA desnaturalizados con un número excesivo de mRNA de β globina conduciría a los fragmentos de β globina a formar híbridos de DNA-RNA de doble cadena, dejando a los otros fragmentos de DNA de cadena única. Hay varias formas en que se podrían separar los híbridos DNA-RNA de los fragmentos de cadena única. Por ejemplo, la mezcla podría pasarse a través de una columna de hidroxilapatita en condiciones iónicas en las que los híbridos se unirían a las sales de fosfato de calcio en la columna, mientras que las moléculas de DNA no hibridadas pasarían sin unirse. Los híbridos podrían liberarse de la columna aumentando la concentración del tampón de elución.

Los experimentos que utilizan la hibridación de los ácidos nucleicos requieren la incubación de dos poblaciones de ácidos nucleicos de cadena única complementarios en condiciones (fuerza iónica, temperatura, etc.) que promuevan la formación de moléculas de cadena doble. Dependiendo del tipo de experimento que se realice, las dos poblaciones de moléculas que reaccionan pueden estar presentes en la solución, o una de las poblaciones puede estar inmovilizada, por ejemplo, por localización dentro de un cromosoma (como en la figura 10.20).

En muchos casos, una de las poblaciones de ácidos nucleicos de cadena única para ser empleado en un experimento de hibridación está presente dentro de un gel. Considere una población de fragmentos de DNA que han sido preparados a partir de DNA

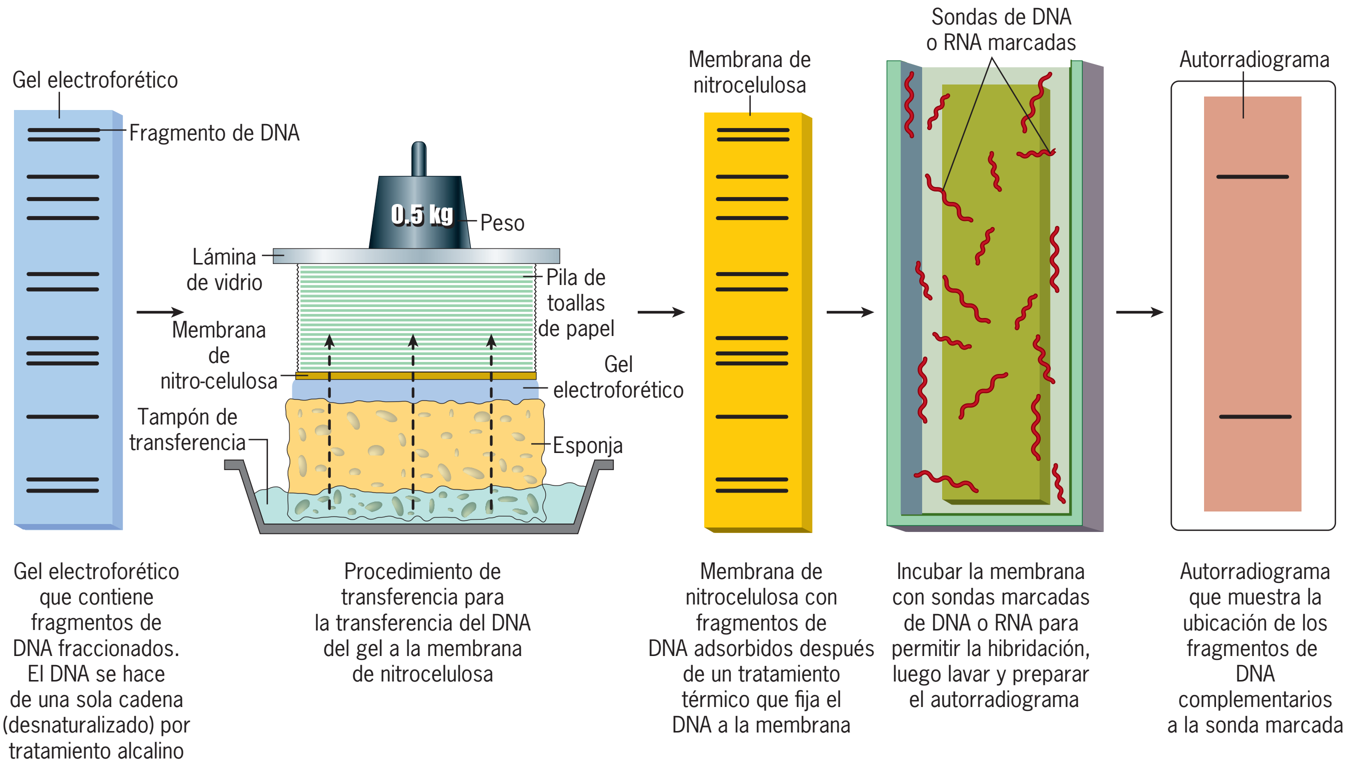



**FIGURA 18-39 Determinación de la ubicación de los fragmentos de DNA específicos en un gel mediante una transferencia Southern.** Como se describe en la figura, los fragmentos de DNA fraccionados se lavan del gel y se atrapan en una membrana de nitrocelulosa, que se incuba con sondas de DNA (o RNA) marcadas radiactivamente (o con fluorescencia). La ubicación de los fragmentos hibridados se determina de forma autorradiográfica (o microscópicamente si las sondas están marcadas con fluorescencia). Durante el procedimiento de transferencia, la acción capilar empuja el tampón hacia arriba en las toallas de papel. A medida que el tampón se mueve a través del gel electroforético, disuelve los fragmentos de DNA y los transfiere a la superficie de la membrana adyacente.

genómico y fraccionados por electroforesis en gel (**FIGURA 18-39**). Para llevar a cabo la hibridación, el gel se trata para obtener el DNA de cadena única, el cual se transfiere del gel a una membrana de nitrocelulosa y se fija en la membrana calentándolo a 80 °C al vacío. El procedimiento por el cual el DNA se transfiere a una membrana se denomina *transferencia*. Una vez que el DNA se une, la membrana se incuba con una sonda de DNA (o RNA) de cadena única marcada, capaz de hibridar a un grupo complementario de fragmentos. Luego, la sonda no unida se elimina por lavado y la ubicación de la sonda unida se determina de forma autorradiográfica como se muestra en la figura 18-39. El experimento que se acaba de describir y que se muestra en la figura 18-39 utilizando una sonda radiactiva se denomina *Southern blot* (llamado así por Edwin Southern, su desarrollador). Uno o unos pocos fragmentos de restricción del DNA que contienen una secuencia de nucleótidos particular pueden identificarse en una transferencia Southern, incluso si hay miles de fragmentos no relacionados presentes en el gel. Un ejemplo de una transferencia Southern se muestra en la figura 10.19. Las moléculas de RNA también pueden separarse por electroforesis e identificarse con una sonda de DNA marcada después de ser transferidas a una membrana. Un ejemplo de este procedimiento, que se denomina *transferencia Northern*, se muestra en la figura 11.33.

Las sondas de DNA se pueden marcar de varias maneras. Una sonda radiactiva incorpora un isótopo radiactivo (como $^{32}$P) en una o más ubicaciones en la molécula. La presencia de la sonda se detecta mediante autorradiografía como se muestra en la figura 18-39. Las sondas también pueden marcarse con fluoróforos y detectarse por fluorescencia. Otra marca comúnmente utilizada es la biotina, una pequeña molécula orgánica que se puede unir covalentemente al esqueleto del DNA. La biotina es detectada por la proteína avidina (o estreptavidina), que se une fuertemente a ella. La avidina en sí debe marcarse para su detección, como con un fluoróforo como se muestra en las figuras 10.20 y 10.21.

La hibridación de los ácidos nucleicos también puede proporcionar una medida de la similitud en la secuencia de los nucleótidos entre dos muestras de DNA, como podría obtenerse, por ejemplo, de dos organismos diferentes. Cuanto más distante sea la relación evolutiva entre las dos especies, mayor será la divergencia de sus secuencias de DNA. Si el DNA purificado de las especies A y B se mezcla, se desnaturaliza y se deja restaurar, un porcentaje de los dúplex de DNA se forman por las cadenas de DNA de las dos especies. Debido a que contienen bases no coincidentes, estos dúplex son menos estables que los formados por las cadenas de DNA de la misma especie, y esta inestabilidad se refleja en la temperatura más baja a la que se funden. Cuando los DNA de las diferentes especies pueden restaurarse en diferentes combinaciones, la temperatura de fusión ($T_m$, sección 10.8) de los dúplex híbridos proporciona una medida de la distancia evolutiva entre los organismos. Otros dos tipos importantes de protocolos de hibridación de los ácidos nucleicos se analizan en detalle en el texto: *hibridación in situ* en la página 386 e *hibridación con microarrays de cDNA* en la página 485.

## 18.19 Síntesis química del DNA

El análisis de la hibridación requiere las moléculas de ácido nucleico de cadena única para su uso como sondas. Otras técnicas fundamentales para la manipulación y el análisis del DNA en el laboratorio también requieren moléculas de ácido nucleico u oligonucleótidos cortas de cadena única. La síntesis química del DNA y el RNA es, por tanto, una tecnología de soporte clave para muchos procedimientos.

El desarrollo de técnicas químicas para sintetizar polinucleótidos que tienen una secuencia de bases específica fue iniciado por H. Gobind Khorana a principios de la década de 1960 como parte de un intento de descifrar el código genético. Khorana y sus colaboradores continuaron refinando sus técnicas, y una década después de su trabajo inicial en el código, lograron sintetizar un gen de tRNA de tirosina bacteriano completo, incluida la región promotora no transcrita. El gen con un total de 126 pares de bases se agrupó en más de 20 segmentos, cada uno de los cuales se sintetizó individualmente y luego se unió por enzimas. Este gen artificial se introdujo luego en células bacterianas portadoras de mutaciones para este tRNA, y el DNA sintético fue capaz de reemplazar la función antes deficiente. El primer gen sintetizado químicamente que codifica una proteína de tamaño promedio, el interferón humano, se preparó en 1981, un esfuerzo que requirió la síntesis y el ensamblaje de 67 fragmentos diferentes para producir un dúplex único de 514 pares de bases que contiene señales de iniciación y terminación reconocidas por la RNA polimerasa bacteriana.

Las reacciones químicas que vinculan los nucleótidos se han automatizado, y la síntesis de oligonucleótidos ahora se lleva a cabo mediante máquinas controladas por computadora conectadas a los reservorios de reactivos. El operador ingresa la secuencia de nucleótidos deseada en la computadora y mantiene el instrumento provisto de materiales. El oligonucleótido es ensamblado un nucleótido a la vez desde el extremo 3′ al 5′ de la molécula, hasta un total de aproximadamente 200 nucleótidos. Modificaciones tales como la biotina y los fluoróforos pueden incorporarse en las moléculas. Si se necesita una molécula de doble cadena, se sintetiza como dos cadenas simples complementarias que pueden hibridarse juntas. Las moléculas sintéticas más largas se fabrican en los segmentos que se unen como se ilustra en el experimento descrito en la página 22.

## 18.20 Tecnología del DNA recombinante

En los últimos 30 años, se han logrado enormes avances en el análisis de los genomas eucarióticos. Este progreso comenzó cuando los biólogos moleculares aprendieron a construir moléculas de **DNA recombinante**, que son moléculas que contienen secuencias de DNA derivadas de más de una fuente. Los DNA recombinantes se pueden utilizar de muchas maneras. Comenzaremos considerando una de las aplicaciones más importantes: el aislamiento desde el genoma de un segmento particular de DNA que codifica un polipéptido particular. Primero, sin embargo, es necesario considerar una clase de enzimas cuyo descubrimiento y uso ha hecho posible la formación de las moléculas de DNA recombinante.

### Endonucleasas de restricción

Durante la década de 1970, se encontró que las bacterias contenían nucleasas que reconocerían secuencias cortas de nucleótidos dentro del DNA dúplex y escindirían el esqueleto del DNA en sitios específicos en ambas cadenas del dúplex. Estas enzimas se denominan **endonucleasas de restricción** de tipo II, o simplemente *enzimas de restricción*. Se les dio este nombre porque funcionan en las bacterias para destruir los DNA virales que podrían entrar en la célula, lo que *restringe* el crecimiento de los virus. La bacteria protege su propio DNA del ataque nucleolítico mediante la metilación de las bases en sitios susceptibles, una modificación química que bloquea la acción de la enzima.

Se han aislado enzimas de varios cientos de diferentes organismos procarióticos que, en conjunto, reconocen más de 100 secuencias de nucleótidos diferentes. Las secuencias reconocidas por la mayoría de estas enzimas son de cuatro a seis nucleótidos y se caracterizan por un tipo particular de simetría interna. Considere la secuencia particular reconocida por la enzima *Eco*R1:

↓
3′—CTTAAG—5′
5′—GAATTC—3′
↑

Se dice que este segmento de DNA tiene una *simetría rotacional doble* porque puede rotarse 180 °C sin cambios en la secuencia de bases. Por tanto, si uno lee la secuencia en la misma dirección (3′ a 5′ o 5′ a 3′) en cualquiera de las cadenas, se observa el mismo orden de bases. Una secuencia con este tipo de simetría se llama *palíndromo*. Cuando la enzima *Eco*R1 ataca este palíndromo, rompe cada cadena en el mismo sitio *en la secuencia*, lo que se indica mediante las flechas entre los residuos A y G. Los puntos rojos indican las bases metiladas en esta secuencia que protegen el DNA del huésped del ataque enzimático. Algunas enzimas de restricción dividen los enlaces directamente opuestos entre sí en las dos cadenas que producen extremos romos, mientras que otras, como *Eco*R1, hacen cortes escalonados.

El descubrimiento y la purificación de las enzimas de restricción han sido invaluables en los avances realizados por los biólogos moleculares en los últimos años. Debido a que una secuencia particular de cuatro a seis nucleótidos ocurre con bastante frecuencia simplemente por casualidad, cualquier tipo de DNA es susceptible a la fragmentación por estas enzimas. El uso de enzimas de restricción permite que el DNA del genoma humano, o el de cualquier otro organismo, se diseccione en un conjunto de fragmentos específicos definidos con precisión. Una vez que el DNA de un individuo en particular se digiere con una de estas enzimas, los fragmentos generados se pueden fraccionar en base a la longitud por electroforesis en gel (como en la **FIGURA 18-40*a***). Diferentes enzimas escinden la misma preparación de DNA en diferentes conjuntos de fragmentos, y los sitios dentro del genoma que se escinden por varias enzimas pueden identificarse y ordenarse en un mapa de restricción como el que se muestra en la figura 18-40*b*).

### Formación de los DNA recombinantes

Los DNA recombinantes se pueden formar de varias maneras. En el método que se muestra en la figura 18-41, las moléculas de DNA de dos fuentes diferentes se tratan con una enzima de restricción que hace cortes escalonados en el dúplex de DNA. Los cortes escalonados dejan colas cortas de una sola fila que actúan como "extremos pegajosos" que se pueden unir a una única cola complementaria de otra molécula de DNA para restaurar una molécula de doble cadena. En el ejemplo representado en la **FIGURA 18-41**, uno de los fragmentos de DNA que formarán la molécula recombinante es un plásmido bacteriano. Los plásmidos son moléculas de DNA pequeñas, circulares y de doble cadena que están separadas del cromosoma bacteriano principal. El otro fragmento de DNA en la figura 18-41 se obtiene a partir de células humanas después del tratamiento con la misma enzima de restricción utilizada para abrir el plásmido. Cuando los fragmentos de DNA humano y el plásmido tratado se incuban juntos en presencia de DNA ligasa, los dos tipos de DNA favorecen los enlaces de hidrógeno entre sí por sus extremos pegajosos y luego se ligan para formar recombinantes de DNA circular, como en la figura 18-41. Las primeras moléculas de DNA recombinante se formaron por este método básico en 1972 por Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang y Stanley Cohen de la Universidad de Stanford y la Universidad de California en San Francisco, marcando el nacimiento de la ingeniería genética moderna.

Al seguir el procedimiento que se acaba de describir, se produce un gran número de moléculas recombinantes diferentes, cada

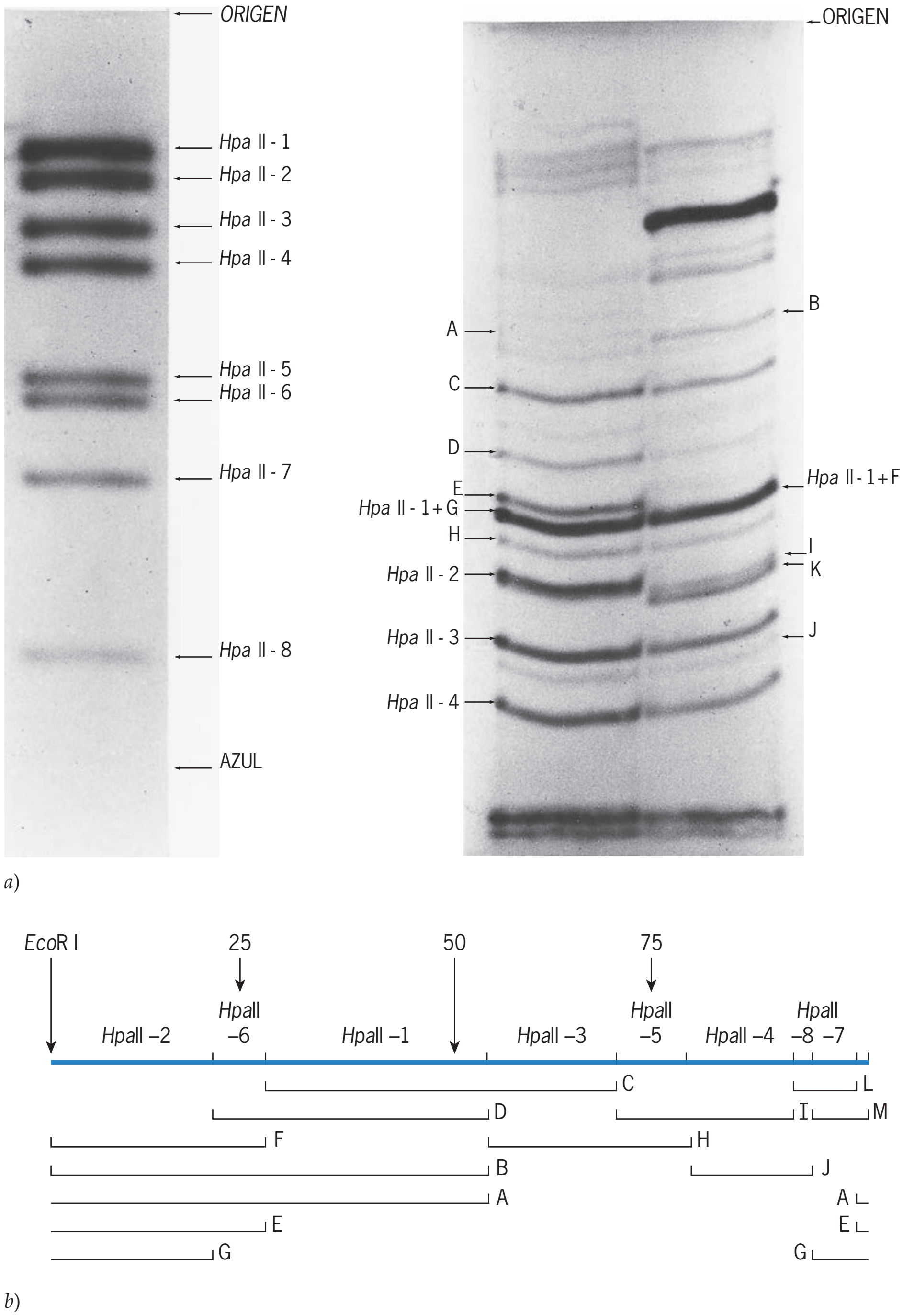



**FIGURA 18-40** La construcción de un mapa de restricción del pequeño genoma circular del polioma del virus tumoral de DNA. *a*) Autorradiografías de fragmentos de DNA marcados con $^{32}P$ que se han sometido a electroforesis en gel. El gel de la izquierda muestra el patrón de los fragmentos de DNA obtenidos después de una digestión completa del genoma del polioma con la enzima *Hpa*II. Para determinar cómo estos ocho fragmentos se juntan para formar el genoma intacto, es necesario tratar el DNA de tal manera que se generen fragmentos superpuestos. Los fragmentos superpuestos se pueden producir tratando el genoma intacto con una segunda enzima que escinde la molécula en diferentes sitios, o tratando el genoma con la misma enzima en condiciones en las que el DNA no está completamente digerido como lo estaba en el gel izquierdo. Los dos geles de la derecha representan los ejemplos de las digestiones parciales del genoma de polioma con *HpaII*. El gel intermedio muestra los fragmentos generados por la digestión parcial del DNA circular superhélico, y el gel de la derecha muestra los fragmentos *HpaII* formados después de que el genoma circular se convierte en una molécula lineal por *Eco*R1 (una enzima que hace sólo un corte en el círculo). *b*) El mapa de restricción del genoma de polioma linealizado basado en la escisión por *Hpa*II. Los ocho fragmentos del resumen completo se muestran a lo largo del DNA en la parte superior. Los fragmentos superpuestos del resumen parcial se muestran en su disposición ordenada debajo del mapa. (Los fragmentos L y M migran a la parte inferior del gel en la parte *a*, lado derecho).

FUENTE: De Beverly E. Griffin, Mike Fried, y Allison Cowie, Proc. *Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 71:2078, 1974.

una de las cuales contiene un plásmido bacteriano con un segmento de DNA humano incorporado en su estructura circular (véase figura 18-42). Supongamos que estaba interesado en aislar un solo gen del genoma humano, por ejemplo, el gen que codifica la insulina. Debido a que su objetivo es obtener una preparación purificada de un tipo de DNA recombinante que contiene el fragmento de codificación de la insulina, debe separar este fragmento de todos los demás. Esto se hace mediante un proceso llamado clonación de DNA. Volveremos a la búsqueda del gen de la insulina después de describir la metodología básica detrás de la clonación del DNA.

## Clonación del DNA

La **clonación del DNA** es una técnica para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico. El segmento de DNA que se va a clonar se vincula primero a un vector de DNA, que es un vehículo para transportar el DNA extraño en una célula huésped adecuada, como la bacteria *E. coli.* El vector contiene secuencias que le permiten replicarse dentro de la célula huésped. Dos tipos de vectores se usan comúnmente para clonar el DNA dentro de los huéspedes bacterianos. En un enfoque, el segmento de DNA que se va a clonar se introduce en la célula bacteriana uniéndolo a un plásmido, como se describe anteriormente, y luego hace que las células bacterianas tomen el plásmido del medio. En un enfoque alternativo, el segmento de DNA se une a una porción del genoma del virus bacteriano lambda (l), y luego se le permite infectar un cultivo de células bacterianas, produciendo grandes cantidades de progenie viral, cada una de las cuales contiene el segmento extraño de DNA. De cualquier manera, una vez que el segmento de DNA está dentro de una bacteria, se replica junto con el DNA bacteriano (o viral) y se reparte en las células hijas (o partículas virales de la progenie). Por tanto, el número de moléculas de DNA recombinante aumenta en proporción al número de células bacterianas (o progenie viral) que se forma. A partir de un único plásmido recombinante o genoma viral dentro

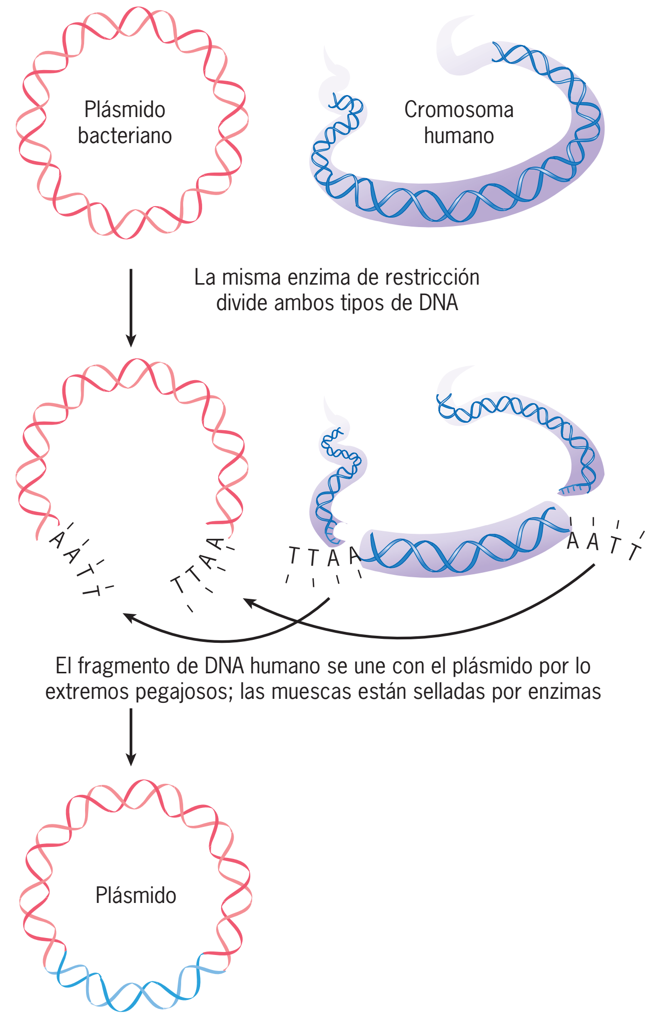



**FIGURA 18-41 Formación de una molécula de DNA recombinante.** En este ejemplo, una preparación de plásmidos bacterianos se trata con una enzima de restricción que realiza un único corte dentro de cada plásmido bacteriano. Esta misma enzima de restricción se usa para fragmentar una preparación de DNA genómico humano en pequeños fragmentos. Debido a que se han tratado con la misma enzima de restricción, el DNA del plásmido escindido y los fragmentos de DNA humano tendrán extremos pegajosos. Cuando estas dos poblaciones se incuban juntas, las dos moléculas de DNA se unen no covalentemente entre sí y luego se sellan covalentemente por la DNA ligasa, formando una molécula recombinante de DNA.

de una célula bacteriana, se pueden formar millones de copias del DNA en un corto periodo. Una vez que la cantidad de DNA se ha amplificado lo suficiente, el DNA recombinante se puede purificar y usar en otros procedimientos. Además de proporcionar un medio para amplificar la cantidad de una secuencia de DNA particular, la clonación también se puede utilizar como una técnica para aislar una forma pura de cualquier fragmento de DNA específico entre una gran población heterogénea de moléculas de DNA. Comenzaremos discutiendo la clonación del DNA utilizando los plásmidos bacterianos.

**CLONACIÓN DEL DNA EUCARIÓTICO EN LOS PLÁSMIDOS BACTERIANOS** El DNA extraño que se va a clonar se inserta primero en el plásmido para formar una molécula de DNA recombinante. Los plásmidos utilizados para la clonación del DNA son versiones modificadas de las que se encuentran en las células bacterianas. Al igual que las contrapartes naturales de las que se derivan, estos plásmidos contienen un origen de replicación y uno o más genes que hacen que la célula receptora sea resistente a uno o más antibióticos. La resistencia a los antibióticos permite a los investigadores seleccionar aquellas células que contienen el plásmido recombinante.

Como lo demostraron por primera vez Avery, Macleod y McCarty (página 379), las células bacterianas pueden absorber el DNA de su medio. Este fenómeno forma la base para la clonación de los plásmidos en las células bacterianas (**FIGURA 18-42**). En la

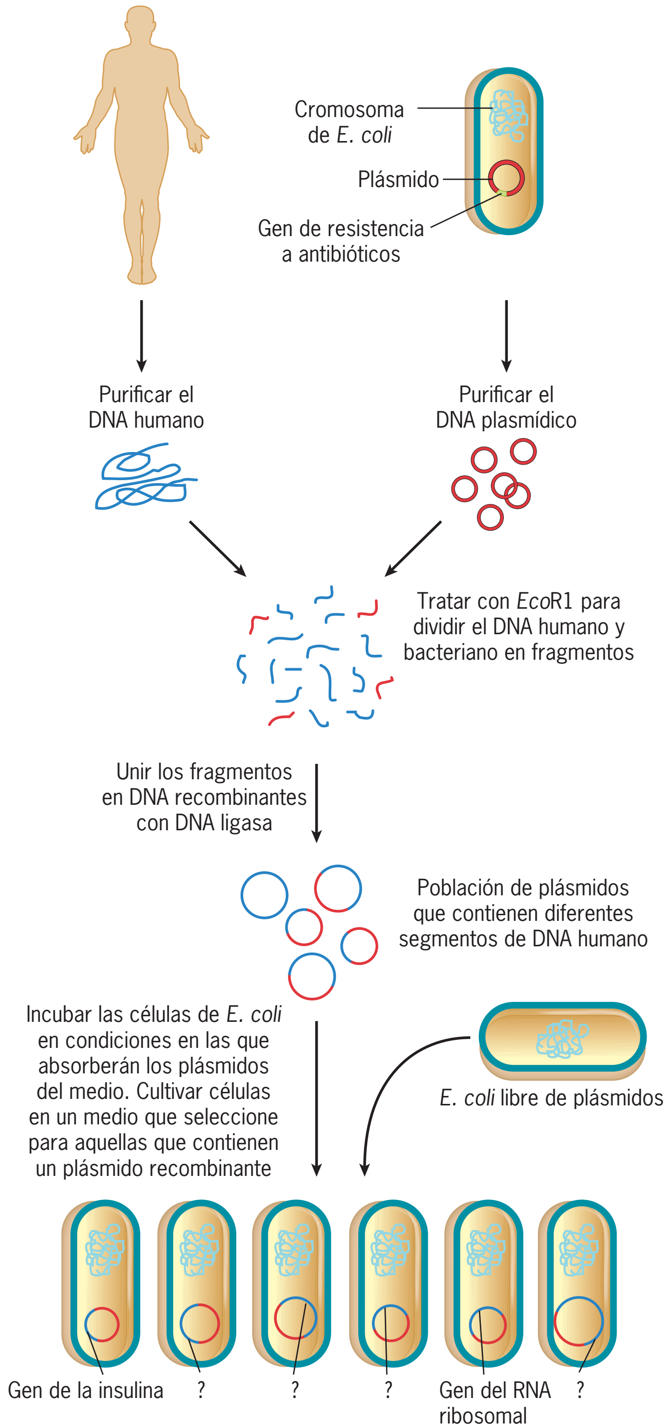



**FIGURA 18-42 Un ejemplo de clonación de DNA utilizando plásmidos bacterianos.** El DNA se extrae de células humanas, se fragmenta con *Eco* R1 y los fragmentos se insertan en una población de plásmidos bacterianos. Existen técnicas disponibles para prevenir la formación de los plásmidos que carecen de un inserto de DNA extraño. Una vez que una célula bacteriana ha recogido un plásmido recombinante del medio, la célula da lugar a una colonia de células que contienen la molécula de DNA recombinante. En este ejemplo, la mayoría de las bacterias contienen DNA eucarióticos de función desconocida (marcados como ?), mientras que una contiene una parte del DNA que codifica el RNA ribosomal y otra contiene el DNA que codifica la insulina.

técnica más empleada, los plásmidos recombinantes se agregan a un cultivo bacteriano tratado previamente con iones de calcio. Cuando se somete a un breve choque térmico, estas bacterias se estimulan para captar el DNA de su medio circundante. Por lo general, sólo un pequeño porcentaje de células son competentes para recoger y retener una de las moléculas plasmídicas recombinantes. Una vez que se adquiere, el plásmido se replica de forma autónoma dentro del receptor y se transmite a la progenie durante la división celular. Aquellas bacterias que contienen un plásmido recombinante pueden seleccionarse entre las demás haciendo crecer las células en presencia del antibiótico al que uno o más genes confieren resistencia en el plásmido.



Comenzamos esta discusión con el objetivo de aislar un pequeño fragmento de DNA que contiene la secuencia del gen de la insulina. Hasta este punto, hemos formado una población de bacterias que contienen muchos plásmidos recombinantes diferentes, muy pocos de los cuales contienen el gen que se está buscando (como en la figura 18-42). Uno de los grandes beneficios de la clonación del DNA es que, además de producir grandes cantidades de DNA particulares, permite separar diferentes DNA de una mezcla. Se señaló anteriormente que las bacterias que contienen plásmidos pueden seleccionarse de aquellas sin plásmidos mediante el tratamiento con antibióticos. Una vez hecho esto, las células portadoras de plásmidos pueden crecer en baja densidad en las placas Petri, de modo que toda la progenie de cada célula (un clon de células) permanezca físicamente separada de la progenie de otras células. Debido a que un gran número de plásmidos recombinantes diferentes estaban presentes inicialmente en el medio, las diferentes células colocadas en la placa contienen diferentes fragmentos de DNA extraño. Una vez que las células que contienen los diversos plásmidos han crecido en colonias separadas, el investigador puede buscar en las colonias las pocas que contienen el gen que se busca, en este caso, el gen de la insulina. La detección se realiza seleccionando colonias individuales y expandiendo la población de cada una en tubos de ensayo que contienen medios. Luego se aísla el DNA plasmídico de las bacterias en cada tubo de ensayo (a menudo utilizando un "kit" de purificación preempacado fácil de usar) y se envía para la secuenciación del DNA.

**CLONACIÓN DE DNA EUCARIÓTICOS EN LOS GENOMAS DE LOS FAGOS** Un vector de clonación menos común es el bacteriófago lambda, que se muestra en la **FIGURA 18-43**. El genoma lambda es una molécula de DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 50 kb de longitud. La cepa modificada utilizada en la mayoría de los experimentos de clonación contiene dos sitios de escisión para la enzima *Eco*R1, que fragmenta el genoma en tres segmentos grandes. Convenientemente, toda la información esencial para la infección y la lisis celular está contenida en los dos segmentos externos, de modo que el fragmento intermedio prescindible se puede reemplazar por un pedazo de DNA eucariótico de hasta aproximadamente 25 kb. Las moléculas de DNA recombinante se pueden empaquetar *in vitro* en las cabezas de los fagos, y estas partículas de fagos diseñadas genéticamente se pueden usar para infectar las bacterias huésped. (Las moléculas de DNA de fago que carecen del inserto son demasiado cortas para ser empaquetadas.) Una vez en una bacteria, el segmento de DNA eucariótico se amplifica junto con el DNA viral y luego se empaqueta en una nueva generación de partículas del virus, que se liberan cuando la célula se lisa. Las partículas liberadas infectan las células nuevas, y pronto se ve un punto claro (o placa) en el "césped" bacteriano en el sitio de la infección. Cada placa contiene millones de partículas de fagos, cada una de las cuales posee una única copia del mismo fragmento de DNA eucariótico.

La clonación del DNA de mayor tamaño en bacterias (como BAC) o levaduras (como YAC) se describe en la página 731.

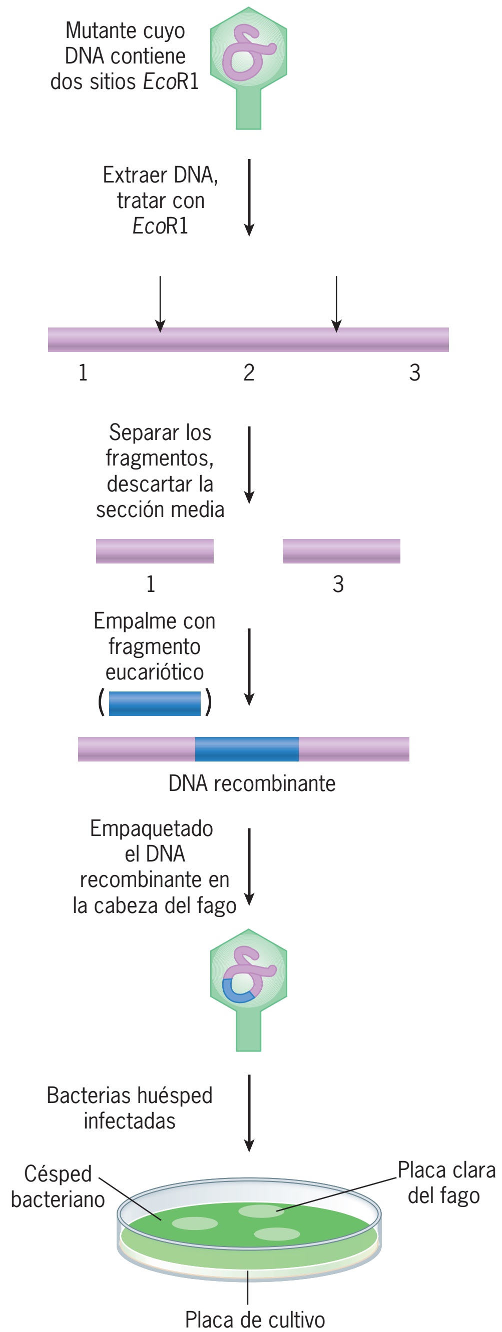



**FIGURA 18-43 Protocolo para la clonación de los fragmentos de DNA eucarióticos en el fago lambda.** Los pasos se describen en el texto.

## 18.21 Amplificación enzimática del DNA por PCR

En 1983, Kary Mullis de Cetus Corporation concibió una nueva técnica que se ha utilizado con frecuencia para amplificar fragmentos de DNA específicos sin la necesidad de células bacterianas. Esta técnica se conoce como **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**, *polymerase chain reaction*). Hay muchos protocolos de PCR diferentes utilizados para una multitud de aplicaciones en las que se puede amplificar una gran población de DNA relacionados. La amplificación por PCR se adapta fácilmente a las plantillas de RNA convirtiéndolas primero en DNA complementarios utilizando transcriptasa inversa.

## Proceso de PCR

El procedimiento básico utilizado en la PCR se muestra en la **FIGURA 18-44**. La técnica emplea una DNA polimerasa estable al calor, llamada *Taq polimerasa*, que originalmente se aisló de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive en aguas termales a temperaturas superiores a 90 °C. En el protocolo más simple, una muestra de DNA se mezcla con una alícuota de *Taq* polimerasa y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con un gran exceso de dos fragmentos cortos de DNA sintéticos (oligonucleótidos) que son complementarios a las secuencias de DNA en el extremo 3′ de la región del DNA a amplificar. Los oligonucleótidos sirven como cebadores (página 518) a los que se agregan los nucleótidos durante los siguientes pasos de replicación. Luego, la mezcla se calienta a aproximadamente 95 °C, que es lo suficientemente caliente como para causar que las moléculas de DNA en la muestra se separen en sus dos cadenas componentes. Luego, la mezcla se enfría a aproximadamente 60 °C para permitir que los cebadores

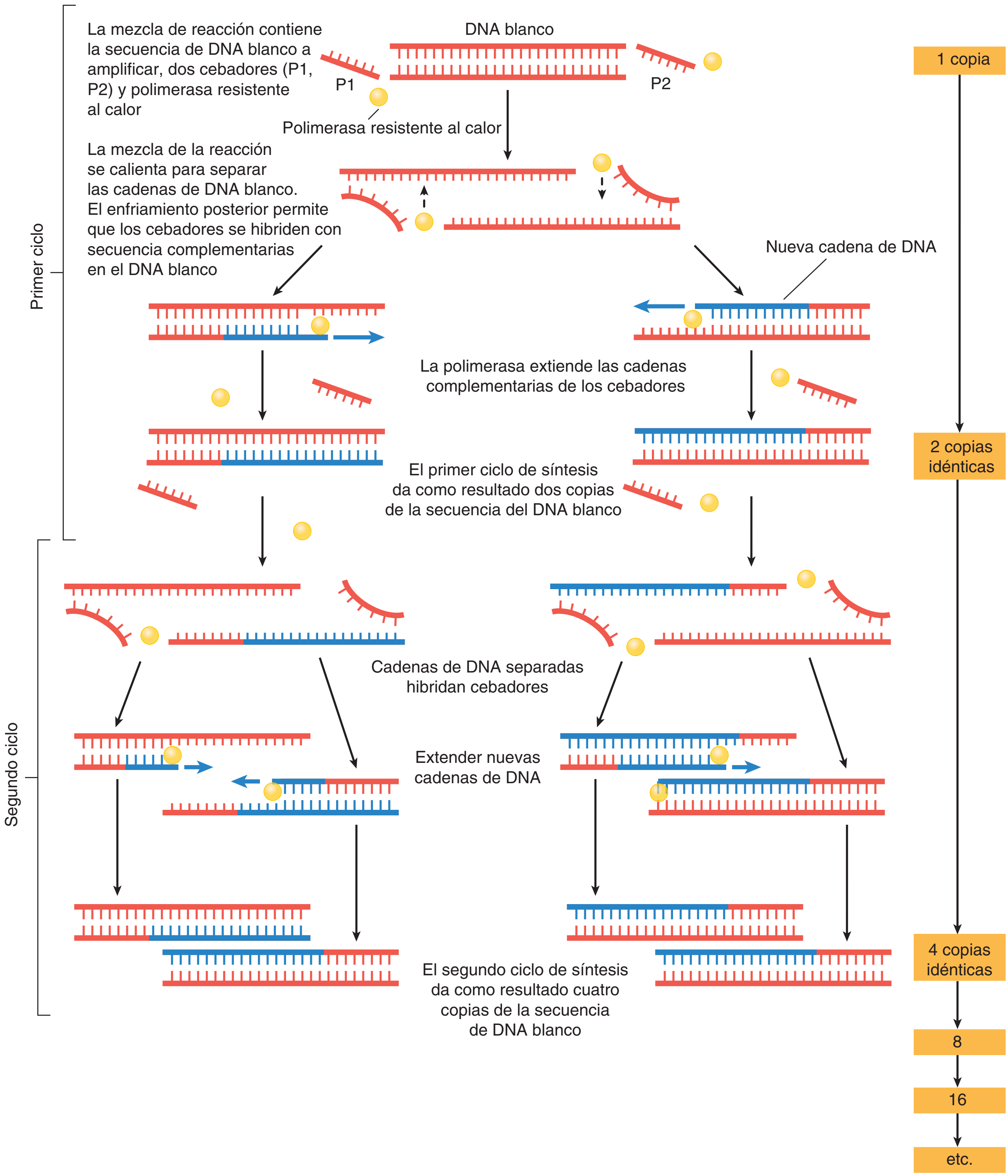



**FIGURA 18-44 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*).** Como se discutió en el texto, el procedimiento aprovecha una DNA polimerasa resistente al calor cuya actividad no se destruye cuando se eleva la temperatura para separar las dos cadenas de la doble hélice. Con cada ciclo de duplicación, las hebras se separan, los segmentos flanqueantes (cebadores) se unen a los extremos de la región seleccionada y la polimerasa copia el segmento intermedio.

se hibriden con las cadenas del DNA blanco, y la temperatura se eleva a unos 72 °C, para permitir que la polimerasa termofílica agregue nucleótidos al extremo 3′ de los cebadores. A medida que la polimerasa extiende el cebador, copia selectivamente el DNA blanco, formando nuevas cadenas de DNA complementarias. La temperatura se eleva una vez más, haciendo que las cadenas de DNA recién formadas y originales se separen unas de otras. Luego, la muestra se enfría para permitir que los cebadores sintéticos en la mezcla se unan una vez más al DNA blanco, que ahora está presente al doble de la cantidad original. Este ciclo se repite, duplicando cada vez la cantidad de la región específica del DNA que está flanqueada por los cebadores unidos. Se pueden generar miles de millones de copias de esta región específica en pocas horas usando un *termociclador* que cambia automáticamente la temperatura de la mezcla de reacción para permitir que cada paso en el ciclo tenga lugar.



### Aplicaciones de PCR

**AMPLIFICAR EL DNA PARA LA CLONACIÓN O EL ANÁLISIS** Desde su invención, la PCR ha encontrado muchos usos. Puede generar muchas copias de un fragmento de DNA específico antes de clonar el fragmento, un enfoque eficiente si la secuencia del blanco se conoce con suficiente detalle para poder especificar la secuencia de nucleótidos de los dos cebadores complementarios. Esto es muy útil en los casos en que el DNA fuente es muy escaso, porque la PCR puede generar grandes cantidades de DNA a partir de muestras minúsculas, como la de una sola célula. La PCR se ha utilizado en investigaciones criminales para generar cantidades de DNA de un punto de sangre seca que queda en la ropa de un sospechoso de crimen o incluso del DNA presente en parte de un solo folículo piloso que queda en la escena del crimen. Con este propósito, se seleccionan regiones del genoma altamente polimórficas (es decir, varían a alta frecuencia dentro de la población) para la amplificación, de modo que no haya dos individuos que tengan los mismos fragmentos de DNA (como en la figura 10.19). Este mismo procedimiento puede utilizarse para estudiar fragmentos de DNA de los restos fósiles bien conservados que pueden tener millones de años. La actividad de la DNA polimerasa en la PCR también se emplea en la secuenciación del DNA (véase sección 18.22).

**PRUEBAS PARA LA PRESENCIA DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE DNA** Supongamos que desea determinar si una muestra de tejido contiene un virus en particular. Puede responder a esta pregunta mediante una hibridación Southern (página 722) o puede usar PCR. En el enfoque de PCR, se aísla el ácido nucleico de la muestra y se agregan cebadores de PCR complementarios al DNA viral, junto con los otros reactivos de PCR. La reacción se deja continuar. Si el genoma del virus está presente en la muestra, los cebadores de PCR se hibridarán y la reacción de PCR generará un producto. Si el virus no está presente, los cebadores de PCR no se hibridarán y no se generará ningún producto. Por tanto, en esta aplicación, la reacción de PCR en sí sirve como sistema de detección.

**COMPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE DNA** Si dos moléculas de DNA tienen la misma secuencia de base, producirán los mismos productos de PCR en las reacciones con cebadores idénticos. Esta es la premisa para los ensayos rápidos que comparan la similitud de dos muestras de DNA, como el DNA genómico de los aislamientos bacterianos. La PCR se realiza en las muestras utilizando varios cebadores, que pueden diseñarse específicamente o generarse de forma aleatoria. Los productos se separan por electroforesis en gel y se comparan. Cuanto más similares sean las secuencias de los genomas bacterianos, más similares serán los productos de la PCR.

**CUANTIFICACIÓN DE LAS PLANTILLAS DE DNA O RNA** La PCR también se puede usar para determinar qué cantidad de una secuencia de nucleótidos específica (DNA o RNA) está presente en una muestra mixta. Un enfoque de esta PCR cuantitativa utiliza la unión de un colorante específico para el DNA de doble cadena con la finalidad de cuantificar la cantidad de producto de doble cadena que se genera. La tasa de acumulación del producto es proporcional a la cantidad de plantillas presentes en la muestra.

Otro enfoque utiliza lo que se ha denominado “balizas moleculares”. Estos son oligonucleótidos informadores cortos con un fluoróforo unido a un extremo y una molécula de extinción en el otro extremo que se hibrida en el medio de la secuencia blanco a amplificar. Mientras el oligonucleótido corto esté intacto, el fluoróforo y el extintor están lo suficientemente cerca para que la fluorescencia se apague. Cuando la DNA polimerasa sintetiza una nueva cadena de DNA complementaria a la plantilla, su actividad exonucleasa (página 523) degrada el oligonucleótido informador. El fluoróforo se separa así del apagador y emite fluorescencia. La cantidad de fluoróforo liberado en un ciclo de PCR dado es directamente proporcional al número de moléculas molde que está copiando la polimerasa.

## 18.22 Secuenciación de DNA

Para 1970, se había determinado la secuencia de aminoácidos de una larga lista de proteínas, pero prácticamente no se avanzó hacia la secuenciación de nucleótidos en el DNA por varias razones. A diferencia de las moléculas de DNA, los polipéptidos vienen en longitudes definidas y manejables; una especie polipeptídica dada podría purificarse fácilmente; se disponía de una variedad de técnicas de segmentación del polipéptido en diversos sitios para producir fragmentos superpuestos; y la presencia de 20 aminoácidos diferentes que tienen propiedades variables hace que la separación y la secuenciación de péptidos pequeños sea una tarea sencilla. Luego, a mediados de la década de 1970, se produjo una revolución en la tecnología de la secuencia de DNA. En 1977, se informó la secuencia de un nucleótido completo de un genoma viral entero, el de $\phi$X174, con una longitud de unos 5 375 nucleótidos. Este hito en la biología molecular se logró en el laboratorio de Frederick Sanger, quien había determinado la primera secuencia de aminoácidos de un polipéptido (insulina) unos 25 años antes. Para el año 2001, se publicó el borrador de la secuencia del genoma humano, equivalente a unos 3 mil millones de pares de bases; el producto de años de trabajo por cientos de científicos.

Estos avances en la secuenciación del DNA fueron posibles gracias a desarrollos en varias áreas: enfoques moleculares para la secuenciación del DNA, instrumentación que podría ser automatizada, computadoras más potentes y ampliamente disponibles y software para el análisis de datos. La clave inicial fue el desarrollo de un enfoque factible para determinar la secuencia de grandes fragmentos de DNA. Este avance en sí mismo fue posible gracias al descubrimiento de enzimas de restricción y al desarrollo de tecnologías de clonación, que proporcionaron los medios necesarios para preparar un fragmento de DNA definido en cantidad suficiente para llevar a cabo los procedimientos bioquímicos necesarios.

Para 1980, una metodología de secuenciación del DNA desarrollada por Sanger y A. R. Coulson del Consejo de Investigación Médica en Cambridge, Inglaterra, había sido aceptada como el método de elección. Tras el desarrollo de la PCR, el enfoque de secuenciación de Sanger-Coulson y la PCR se fusionaron en un procedimiento que combina la bioquímica de Sanger-Coulson con los ciclos repetitivos y la automatización de la PCR. Esta llamada secuenciación de ciclos llegó a ser utilizada en el geno-

ma y sus pasos básicos están resumidos en la **FIGURA 18-45**. Aunque el enfoque Sanger-Coulson ya no se usa en los principales proyectos de secuenciación de DNA, su importancia histórica como técnica empleada en todos los estudios anteriores de secuenciación del genoma, incluido el del Proyecto del Genoma Humano, también la elegancia de su metodología bioquímica, hace de una breve descripción una valiosa herramienta de aprendizaje en biología molecular.

En este procedimiento, uno comienza con una población de moléculas de plantillas idénticas, ya sea un producto de PCR o un fragmento de DNA clonado. La plantilla del DNA se mezcla con un cebador complementario al extremo 3′ de una cadena de la región a secuenciar. La mezcla de la reacción también contiene la DNA polimerasa *Taq* termoestable, los cuatro precursores de trifosfato de desoxirribonucleósido (dNTPs, *deoxyribonucleoside triphosphate precursors*) y una baja concentración de precursores modificados llamados *trifosfatos de didesoxirribonucleósido* o *ddNTP.* Cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) se ha modificado mediante la adición de un colorante fluorescente de diferente color en su extremo 3′. La reacción de secuenciación comienza, como la PCR, calentando la mezcla a una temperatura que hace que las dos cadenas de la plantilla se desnaturalicen (figura 18-45*a*), paso 1). A continuación, la reacción se enfría para que el cebador pueda hibridar con el DNA de plantilla (paso 2). Tenga en cuenta que, a diferencia de la PCR, sólo está presente un cebador, de modo que sólo una de las dos cadenas de DNA de la plantilla puede hibridar con un cebador. En el paso 3, la polimerasa *Taq* agrega dNTP al final del cebador que es complementario a la molécula de la plantilla, sintetizando una nueva cadena complementaria de DNA. De vez en cuando, la polimerasa inserta un ddNTP en lugar de un dNTP. Los dideoxinucleótidos carecen de un grupo hidroxilo en sus posiciones 2′ y 3′. Cuando uno de estos nucleótidos se ha incorporado al final de una cadena en crecimiento, la falta de 3′ OH hace imposible que la polimerasa agregue otro nucleótido, lo que causa la terminación de la cadena (figura 18-45, paso 4). Debido a que el ddNTP está presente en una concentración mucho menor en la mezcla de la reacción que el dNTP correspondiente, la incorporación del ddNTP es infrecuente y aleatoria; puede incorporarse cerca del comienzo de una cadena, cerca de la mitad de otra, o no hasta el final de una tercera. Independientemente, cuando se incorpora el ddNTP, el crecimiento de la cadena cesa en ese punto.

Una vez que se completa la fase de extensión de la cadena de la reacción, la temperatura se eleva de nuevo para desnaturalizar la nueva doble cadena de las moléculas de DNA. El ciclo de hibridación, síntesis y desnaturalización se repite muchas veces, gene-

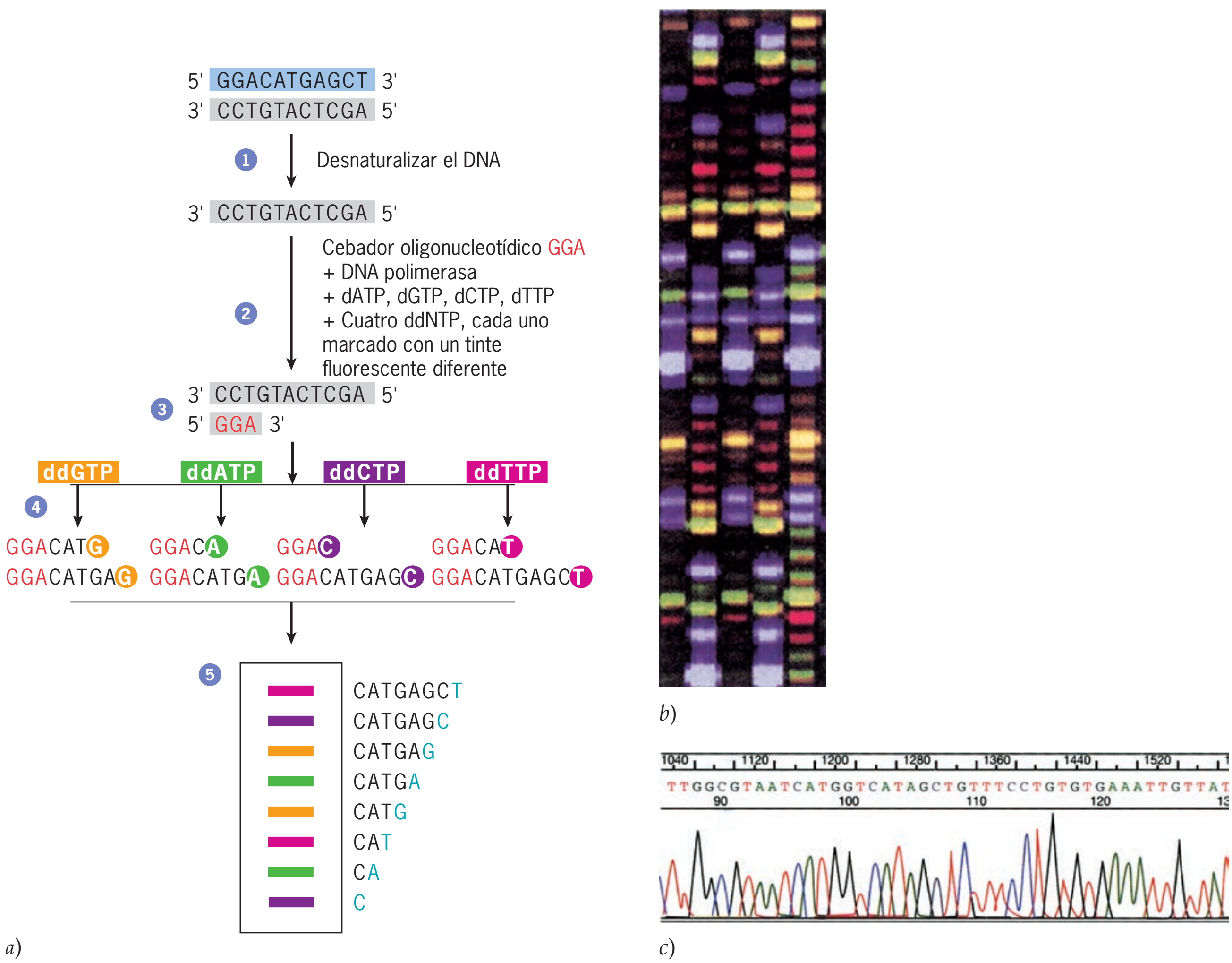



**FIGURA 18-45 Secuenciación de DNA.** *a*) Los pasos básicos para secuenciar un pequeño fragmento hipotético mediante la técnica de Sanger-Coulson (dideoxi), como se describe en el texto. *b*) Carriles de gel en los que se han separado moléculas hijas marcadas con fluorescencia. El color de la banda se determina por la identidad del didesoxinucleótido en el extremo 3′ de la cadena de DNA. *c*) La secuencia de nucleótidos en la línea de la plantilla se interpreta por una computadora que "lee" desde la parte inferior hasta la parte superior del gel, utilizando la intensidad y la longitud de onda de la luz fluorescente como entrada. La computadora genera un "electroferograma" que muestra la intensidad y el color de la fluorescencia detectada, junto con la interpretación de la secuencia de DNA.

FUENTE: *b*, *c*) De Leroy Hood y David Galas, Nature 421: 445, 2003, Fig. 1c y 1d. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

rando una gran población de cadenas de DNA hijas que ahora incluye moléculas en las que se ha incorporado un ddNTP en cada posición. Por cada A en la línea de la plantilla, por ejemplo, habrá moléculas hijas que terminarán en un ddTTP en esa posición. Cuando se completan todos los ciclos, los productos de reacción se separan mediante electroforesis en geles capilares muy delgados (figura 18-45, paso 5).

La electroforesis en gel de alta resolución puede separar fragmentos que difieren en una longitud de un solo nucleótido, de modo que cada banda sucesiva en el gel contiene moléculas que son un nucleótido más largo que las de la banda anterior. Debido a que cada ddNTP se marcó con un colorante fluorescente único, el color de la banda (según lo leído por un detector láser automatizado) revela la identidad del nucleótido terminal en cada molécula hija (figura 18-45*b*). El orden de los colores en el gel, por tanto, corresponde a la secuencia de bases de la molécula plantilla (figura 18-45*c*).

A partir de 2005, se produjo una revolución en la tecnología de secuenciación de DNA, impulsada por el objetivo de secuenciar genomas, tanto humanos como otros, de manera rápida y económica. Los costos para la secuenciación de cantidades masivas de DNA han disminuido drásticamente en los últimos años, y para 2014 fue posible secuenciar el genoma de una persona dada por un costo en el rango de alrededor de mil dólares, que es el orden de magnitud más barato de hace unos pocos años.

Este progreso ha sido posible gracias al desarrollo de estrategias completamente nuevas para la secuenciación del DNA. La primera de estas se conoce como *secuenciación masivamente paralela* (o secuenciación de 2a. generación, véase el video del Tutorial Experimental para el capítulo 10) y ha dominado los esfuerzos de secuenciación genómica durante los últimos años. A diferencia de los pasos de secuenciación del proyecto del genoma humano original, las tecnologías de secuenciación masivamente paralelas no requieren que las partes del genoma se clonen en levaduras o bacterias. En cambio, los fragmentos se preparan directamente en todo el genoma y cada uno luego se amplifica para formar una gran población. Al igual que el enfoque de Sanger-Coulson, las técnicas de secuenciación paralelas se basan en la síntesis de DNA dependiente de la polimerasa, pero no utilizan la terminación prematura de la cadena ni requieren la separación de las cadenas por electroforesis, lo que limita el número de muestras que se pueden monitorear de forma simultánea. En su lugar, logran la identificación directa de los nucleótidos individuales a medida que son incorporados por las polimerasas en tiempo real. Se dispone de varios instrumentos, cada uno de los cuales puede realizar una variación de este tipo de secuenciación rápida y automatizada del DNA. En todos estos casos, grandes cantidades (hasta ~$10^9$) de moléculas de DNA se inmovilizan en una superficie y luego se incuban con DNA polimerasa en presencia de cuatro NTP diferentes. Se utilizan varias estrategias para identificar los nucleótidos que se incorporan secuencialmente en cada una de las cadenas complementarias a medida que se sintetizan en los números masivos de plantillas de DNA "paralelas".

Las cadenas que se sintetizan en todas estas plataformas son relativamente cortas (menos de 100 bases de longitud) en comparación con los secuenciadores anteriores que utilizaron métodos electroforéticos (unas 800 bases de longitud). Estos secuenciadores más recientes también son más propensos a errores que los instrumentos utilizados en los esfuerzos de la primera generación. Sin embargo, hay tantas copias de cada cadena de DNA que se leen simultáneamente, que se puede lograr una alta precisión al determinar la secuencia más abundante generada. Los segmentos cortos que se sintetizan (llamados "lecturas") se convierten en un problema cuando los investigadores intentan determinar la secuencia de DNA del genoma de una nueva especie, ya que puede ser muy difícil unir (ensamblar) un gran número de lecturas cortas en las moléculas de DNA muy largas presentes en un cromosoma eucariótico. En consecuencia, estas tecnologías de secuenciación del DNA son las más adecuadas para estudiar genomas individuales de una especie, como la humana, donde los investigadores ya poseen un genoma de referencia en el que se puede colocar un fragmento de DNA determinado. A pesar de los desafíos, los genomas de nuevas especies, como el panda, se han ensamblado utilizando estos instrumentos. Otro problema con el uso de los secuenciadores paralelos es que los datos de una persona no se pueden clasificar en genomas haploides maternos y paternos separados, o sus haplotipos (página 402). Esto puede limitar su utilidad en aplicaciones para la medicina genómica.

En los últimos años, una nueva colección de instrumentos de secuenciación del DNA, a menudo conocidos como secuenciadores de *tercera generación*, se han introducido (y se incluirán) en el mercado. Como grupo, estos secuenciadores utilizan estrategias mecanísticas muy diferentes para determinar las secuencias de los nucleótidos, aunque la mayoría de ellas actúan sobre las moléculas de DNA individuales (lo que elimina la necesidad de amplificación del DNA), generan lecturas largas (por ejemplo, 1 000 nucleótidos) y operan a un costo menor y tasas más rápidas que los instrumentos de segunda generación. Consideraremos brevemente un par de estas estrategias de secuenciación. En un caso, la secuenciación se lleva a cabo tirando de cada molécula de DNA a través de un orificio pequeño o "nanoporo" e identificando cada nucleótido, uno a la vez, a medida que pasa a través de la abertura. La identificación de los nucleótidos se basa en las diferencias en las propiedades iónicas entre los cuatro nucleótidos que pueden detectarse a medida que cada nucleótido pasa uno tras otro a través del nanoporo. Con un gran número de nanoporos que operan simultáneamente, es posible el potencial para una secuenciación muy rápida. Otros secuenciadores de tercera generación trabajan en un enfoque de "secuenciación por síntesis". En uno de estos instrumentos, un sistema de detección basado en láser identifica nucleótidos marcados con fluorescencia a medida que se incorporan mediante una única DNA polimerasa que se mueve progresivamente a lo largo de una cadena de DNA. Cien mil o más de estas reacciones se monitorean simultáneamente en diferentes cadenas de DNA, generando así grandes cantidades de datos durante cortos periodos de incubación ("corridas").

Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos de un segmento de DNA, se pueden emplear varias herramientas de software para analizarla. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos codificada por el DNA se puede determinar y comparar con otras secuencias de aminoácidos conocidas para proporcionar información sobre la posible función del polipéptido. La secuencia de aminoácidos también proporciona pistas sobre la estructura terciaria de la proteína, particularmente aquellas partes del polipéptido que pueden actuar como segmentos de membrana de las proteínas integrales de la membrana. La secuencia de los nucleótidos en sí también puede compararse con otras secuencias de nucleótidos conocidas. Dichas comparaciones pueden usarse para evaluar la relación evolutiva o la historia de las secuencias de DNA, para identificar el fragmento de DNA recién secuenciado, o comparar las características genómicas de diversos organismos o individuos.

## 18.23 Bibliotecas de DNA

La clonación del DNA se usa a menudo para producir bibliotecas, que son colecciones de fragmentos de DNA clonados. Se pueden crear dos tipos básicos de bibliotecas de DNA: las bibliotecas genómicas y las bibliotecas de cDNA. Las *bibliotecas genómicas* se producen a partir del DNA total extraído de los núcleos y contienen todas las secuencias de DNA de la especie. Una vez que la biblioteca genómica de una especie está disponible, los investigadores pueden usar la colección para aislar secuencias específicas, como las que contienen el gen de la insulina humana. Las *biblio-*

*tecas de cDNA*, por otro lado, se derivan de copias de DNA de una población de RNA. Las bibliotecas de cDNA se producen normalmente a partir de RNA mensajeros presentes en un tipo de célula particular y, por tanto, corresponden a los genes que están activos en ese tipo de célula.

## Bibliotecas genómicas

Primero examinaremos la producción de una biblioteca genómica. En un enfoque, el DNA genómico se trata con una o dos enzimas de restricción que reconocen secuencias de nucleótidos muy cortas en condiciones de baja concentración de enzimas, de manera que sólo un pequeño porcentaje de sitios susceptibles se escinden. Dos enzimas de uso común que reconocen las secuencias de tetranucleótidos son *Hae*III (reconoce GGCC) y *Sau*3A (reconoce GATC). Se esperaría que un tetranucleótido dado ocurriera por casualidad con una frecuencia tan alta que cualquier segmento importante de DNA sea sensible a la fragmentación. Una vez que el DNA se digiere parcialmente, la digestión se fracciona mediante la electroforesis en gel o la centrifugación en gradiente de densidad, y los fragmentos de tamaño adecuado (por ejemplo, 20 kb de longitud) se incorporan en las partículas del fago lambda. Estos fagos se utilizan para generar el millón o más de placas necesarias para garantizar que cada segmento individual del genoma de un mamífero esté representado.

Debido a que el DNA se trata con enzimas en condiciones en las que la mayoría de los sitios susceptibles no se escinden, para todos los propósitos prácticos, este se fragmenta aleatoriamente. Una vez que se producen los recombinantes del fago, se pueden almacenar para su uso posterior y constituir una colección permanente de todas las secuencias de DNA presentes en el genoma de la especie. Cada vez que un investigador quiere aislar una secuencia particular de la biblioteca, las partículas del fago pueden cultivarse en las bacterias y las diversas placas (cada una originada por la infección de un fago recombinante único) se pueden examinar para detectar la presencia de esa secuencia mediante la hibridación *in situ*.

El uso del DNA escindido aleatoriamente tiene una ventaja en la construcción de una biblioteca porque genera fragmentos superpuestos que pueden usarse en el análisis de las regiones del cromosoma que se extienden en ambas direcciones desde una secuencia particular, una técnica conocida como *caminata cromosómica*. Por ejemplo, si se aísla un fragmento que contiene la región codificante de un gen de la globina, ese fragmento particular se puede marcar y usar como una sonda para detectar la biblioteca genómica en busca de los fragmentos con los que se superpone. Luego se repite el proceso utilizando los nuevos fragmentos como sondas marcadas en pasos de selección sucesivos, a medida que uno aísla gradualmente una parte más larga de la molécula de DNA original. Usando este enfoque, se puede estudiar la organización de las secuencias vinculadas en una región extendida de un cromosoma.

Ni el plásmido ni los vectores del fago lambda son adecuados para clonar el DNA de más de aproximadamente 20 a 25 kb de longitud. Se han desarrollado varios vectores que permiten a los investigadores clonar fragmentos de DNA mucho más grandes. Uno de los más importantes de estos vectores es el **cromosoma artificial de levadura** (**YAC**, *yeast artificial chromosome*), que puede aceptar segmentos de DNA extraño tan grandes como 1 000 kb (un millón de pares de bases). Como su nombre lo indica, los YAC son versiones artificiales de un cromosoma de levadura normal. Contienen todos los elementos de un cromosoma de levadura necesarios para que la estructura se replique durante la fase S y se segregue en células hijas durante la mitosis, incluidos uno o más orígenes de la replicación, los telómeros en los extremos de los cromosomas y un centrómero para las fibras del huso pueden unirse durante la separación de los cromosomas. Además de estos elementos, los YAC se construyen para contener 1) un gen cuyo producto codificado permite seleccionar aquellas células que contienen el YAC de las que carecen del elemento y 2) el fragmento de DNA a clonar. Al igual que otras células, las células de levadura pueden absorber el DNA de su medio, lo que proporciona las vías por las cuales los YAC se introducen en las células.

En los últimos años, los laboratorios que participan en la secuenciación de los genomas se han basado en gran medida en un vector de clonación alternativo, llamado **cromosoma artificial bacteriano** (**BAC**, *bacterial artificial chromosome*), el cual es también capaz de aceptar grandes fragmentos de DNA extraño (hasta aproximadamente 500 kb). Los BAC son plásmidos bacterianos especializados (factores F) que contienen un origen de replicación bacteriano y los genes necesarios para regular su propia replicación. Los BAC tienen la ventaja sobre los YAC en los proyectos de secuenciación de alta velocidad porque pueden clonarse en *E. coli*, que capta fácilmente el DNA exógeno, tiene un tiempo de generación extremadamente corto, se puede cultivar a alta densidad en medios simples y no "corrompe" el DNA clonado a través de la recombinación.

Los fragmentos de DNA clonados en YAC y BAC suelen tener una longitud superior a 100 kb. Esos fragmentos de gran tamaño generalmente se producen por tratamiento del DNA con enzimas de restricción que reconocen secuencias de nucleótidos particularmente largas (de siete a ocho nucleótidos) que contienen dinucleótidos CG. Como se indica en la página 500, los dinucleótidos CG tienen funciones especiales en el genoma de los mamíferos y, presumiblemente, debido a esto, no aparecen tan a menudo. La enzima de restricción *Not*1, por ejemplo, que reconoce la secuencia de 8 nucleótidos GCGGCCGC, divide el DNA de los mamíferos en fragmentos de varios cientos de miles de pares de bases de longitud. Estos fragmentos pueden incorporarse luego en el YAC o el BAC y clonarse dentro de las células huésped bacterianas o de levadura.

## Bibliotecas de cDNA

Hasta este punto, la discusión se ha restringido a clonar fragmentos de DNA aislados del DNA extraído, es decir, fragmentos genómicos. Cuando se trabaja con DNA genómico, generalmente se busca aislar un gen particular o una familia de genes de entre cientos de miles de secuencias no relacionadas. Además, el aislamiento de los fragmentos genómicos permite estudiar una variedad de temas, que incluyen 1) secuencias reguladoras que flanquean la parte de codificación de un gen; 2) secuencias intermedias no codificantes; 3) varios miembros de una familia multigénica, que a menudo se encuentran muy juntas en el genoma; 4) la evolución de las secuencias de DNA, incluida su duplicación y reorganización, como se ve en las comparaciones del DNA de diferentes especies; y 5) interspersión de elementos genéticos transponibles.

La clonación de cDNA, en oposición a los DNA genómicos, ha sido especialmente importante en el análisis de la expresión génica y el empalme alternativo. Para producir una biblioteca de cDNA, se aísla una población de mRNA y se usa como plantilla por la transcriptasa inversa para formar una población de híbridos DNA-RNA, como se muestra en la **FIGURA 18-46*a***). Los híbridos de DNA-RNA se convierten en una población de cDNA de doble cadena al cortar el RNA con la RNAasa H y reemplazarlo por DNA polimerasa I. El cDNA de doble cadena se combina con el vector deseado (en este caso, un plásmido) y se clona como se muestra en la figura 18-46*b*). Las poblaciones de RNA mensajero generalmente contienen miles de mensajes diferentes, pero las especies individuales pueden estar presentes en números muy diferentes (abundancia). Como resultado, una biblioteca de cDNA debe contener un millón o más de clones de cDNA diferentes para estar seguros de que los mRNA más raros serán representados. Además, la transcriptasa inversa no es una enzima muy eficiente y tiende a desprenderse de la plantilla de su mRNA

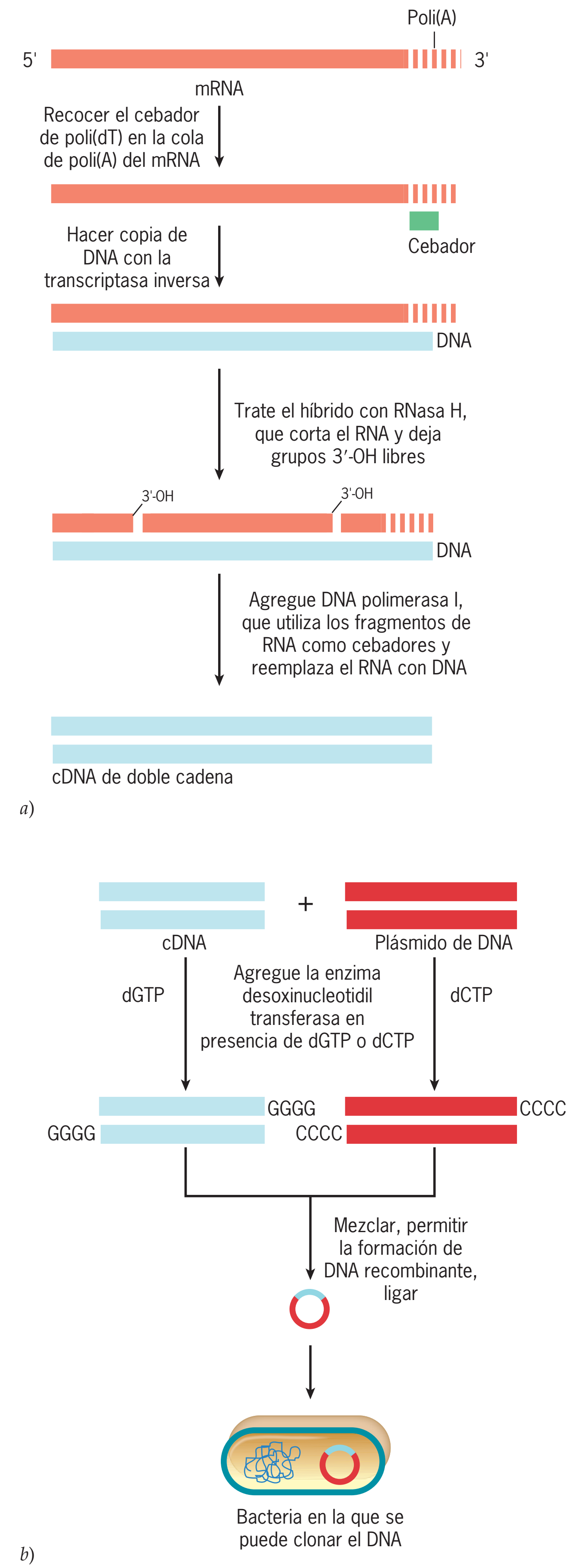



**FIGURA 18-46 Síntesis de cDNA para la clonación en un plásmido.** *a*) En este método de formación de cDNA, un cebador corto de poli(dT) se une al poli(A) de cada mRNA, y el mRNA se transcribe por la transcriptasa inversa (que requiere que el cebador inicie la síntesis del DNA). Una vez que se forma el híbrido DNA-RNA, el RNA se corta mediante el tratamiento con RNasa H, y se agrega la DNA polimerasa I para digerir el RNA y reemplazarlo con DNA, tal como lo hace durante la replicación del DNA en una célula bacteriana (página 523). *b*) Para preparar el cDNA de extremo romo para la clonación, se agrega un tramo corto de poli (G) a los extremos 3′ del cDNA y se agrega un tramo complementario de poli(C) a los extremos 3′ del DNA plasmídico. Los dos DNA se mezclan y se permite que formen recombinantes, que se sellan y se usan para transformar las células bacterianas en las que ellos son clonados.

antes de que se complete el trabajo de copia. Como resultado, puede ser difícil obtener una población de cDNA de longitud completa. Al igual que con los experimentos que utilizan fragmentos de DNA genómico, los clones deben rastrearse para aislar una secuencia particular de una población heterogénea de moléculas recombinantes.

El análisis de los cDNA clonados cumple varias funciones. En general, es más fácil estudiar una población diversa de cDNA que la población correspondiente de mRNA, por lo que uno puede usar los cDNA para conocer la diversidad y abundancia de los mRNA presentes en una célula, el porcentaje de mRNA compartido por dos tipos diferentes de células o la variedad de mRNA empalmados alternativamente y generados a partir de una transcripción primaria específica. Una sola molécula de cDNA clonada y amplificada también es muy útil. En esfuerzos más prácticos, el cDNA purificado puede secuenciarse fácilmente para proporcionar un atajo encaminado a determinar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido; los cDNA marcados se utilizan como sondas para detectar secuencias complementarias entre clones recombinantes; y debido a que carecen de intrones, los cDNA tienen una ventaja sobre los fragmentos genómicos cuando se intenta sintetizar proteínas eucariotas en cultivos de células bacterianas.

## 18.24 Transferencia de DNA en las células eucariotas y en los embriones de mamíferos

Hemos discutido en secciones anteriores cómo los genes eucarióticos se pueden aislar, modificar y amplificar. En esta sección consideraremos algunas de las formas en que los genes pueden introducirse en las células eucariotas, donde generalmente se transcriben y traducen. Una de las estrategias más utilizadas para lograr este objetivo es incorporar el DNA en el genoma de un virus no replicante y permitir que el virus infecte la célula. La transferencia de genes mediada por virus se llama **transducción**. Dependiendo del tipo de virus utilizado, el gen de interés puede expresarse de forma transitoria durante un periodo de horas a días, o puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula huésped. La integración estable generalmente se realiza utilizando retrovirus modificados, que contienen un genoma de RNA que se transcribe de forma inversa en el DNA dentro de la célula. La copia del DNA se inserta en el DNA de los cromosomas del huésped. Los retrovirus se han utilizado en muchos de los intentos recientes de terapia génica para transferir un gen a las células de un paciente que carece de ese gen. En general, estos ensayos clínicos no han tenido mucho éxito debido a la baja eficacia de la infección de los vectores virales actuales.

Hay varios procedimientos disponibles para introducir el DNA desnudo en las células cultivadas, uno de estos procesos es llamado **transfección**. La mayoría de las veces, las células se tratan con fosfato de calcio o DEAE-dextrano, ambos forman un complejo con el DNA agregado que promueve su adherencia a la superficie celular. Se estima que sólo 1 de cada $10^5$ células capta el DNA y lo incorpora de forma estable en los cromosomas. No se sabe por qué este pequeño porcentaje de células en la pobla-

ción es capaz de ser transfectado, pero las que se transfectan generalmente recogen varios fragmentos. Una forma de seleccionar aquellas células que han absorbido el DNA extraño es incluir un gen que permita que las células transfectadas crezcan en un medio particular en el que las células no transfectadas no puedan sobrevivir. Debido a que las células transfectadas suelen ocupar más de un fragmento, el gen utilizado para la selección no necesita ubicarse en el mismo fragmento de DNA que el gen cuyo papel se está investigando (llamado **transgén**).

Otros dos procedimientos para transfectar células son la electroporación y la lipofección. En la *electroporación*, las células se incuban con DNA en viales especiales que contienen electrodos que emiten un breve pulso eléctrico. La aplicación de la corriente hace que la membrana plasmática se vuelva transitoriamente permeable a las moléculas de DNA, algunas de las cuales encuentran su camino hacia el núcleo y se integran en los cromosomas. En la *lipofección*, las células se tratan con DNA que está unido a los lípidos cargados positivamente (liposomas catiónicos) que son capaces de fusionarse con la bicapa lipídica de la membrana celular y entregar el DNA al citoplasma.

Una de las formas más directas de introducir genes extraños en una célula es microinyectar DNA directamente en el núcleo de la célula. Los núcleos de los ovocitos y los huevos son particularmente adecuados para este enfoque. Los ovocitos de *Xenopus*, por ejemplo, se han utilizado durante mucho tiempo para estudiar la expresión de los genes extraños. El núcleo del ovocito contiene toda la maquinaria necesaria para la síntesis de RNA; cuando se inyecta DNA extraño en el núcleo, se transcribe fácilmente. Además, los RNA sintetizados a partir de las plantillas inyectadas se procesan normalmente y se transportan al citoplasma, donde se traducen en proteínas que pueden detectarse inmunológicamente o en virtud de su actividad específica.

Otro blanco favorito para el DNA inyectado es el núcleo de un embrión de ratón (**FIGURA 18-47**). El objetivo de estos experimentos no es controlar la expresión del gen en la célula inyectada, sino hacer que el DNA extraño se integre en los cromosomas del huevo para que se transmita a todas las células del embrión y al adulto posterior. Los animales que han sido diseñados genéticamente para que sus cromosomas contengan genes extraños se denominan **animales transgénicos**, y proporcionan un medio para monitorear cuándo y dónde se expresan los genes particulares del embrión (como en la figura 12.34), y para determinar el impacto de las copias adicionales de genes particulares en el desarrollo y la vida del animal.

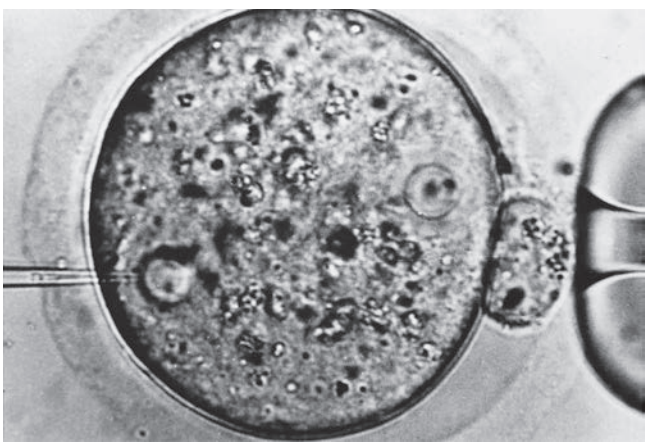


**FIGURA 18-47 Microinyección de DNA en el núcleo de un óvulo de ratón recientemente fertilizado.** El huevo se mantiene en su lugar, con una pipeta de succión que se muestra a la derecha, mientras que la pipeta de inyección se muestra penetrando en el huevo a la izquierda.

FUENTE: De Thomas E. Wagner *et al*., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6377, 1981.

## Animales transgénicos

En 1981, Ralph Brinster de la Universidad de Pennsylvania y Richard Palmiter de la Universidad de Washington lograron introducir un gen para la hormona de crecimiento de la rata (GH, *growth hormone*) en los huevos fertilizados de ratones. El DNA inyectado se construyó de modo que contuviera la parte codificante del gen de GH de rata en una posición justo aguas abajo de la región promotora del gen de metalotioneína de ratón. En condiciones normales, la síntesis de la metalotioneína aumenta mucho después de la administración de metales, como el cadmio o el zinc, u hormonas glucocorticoides. El gen de la metalotioneína tiene un promotor fuerte, y se esperaba que al colocar el gen de la GH aguas abajo podría permitir que el gen de la GH se expresara después del tratamiento de los ratones transgénicos con metales o glucocorticoides. Como se ilustra en la **FIGURA 18-48**, esta expectativa estaba totalmente justificada.

En el aspecto práctico, los **animales transgénicos** proporcionan un mecanismo para crear modelos animales, que son animales de laboratorio que muestran una enfermedad humana particular a la que normalmente no estarían sujetos. Este enfoque es ilustrado por los ratones transgénicos que portan un gen que codifica una versión mutante de la proteína precursora del amiloide humano (APP, *amyloid precursor protein*). Como se discutió en la página 64, estos ratones desarrollan síntomas neurológicos y de comportamiento que recuerdan a la enfermedad de Alzheimer y son un recurso importante en el desarrollo de terapias para esta terrible enfermedad. Los animales transgénicos también se están desarrollando como parte de la biotecnología agrícola. Por ejemplo, los cerdos nacidos con genes extraños de la hormona de crecimiento incorporados en sus cromosomas crecen mucho más delgados que los animales de control que carecen de los genes. La carne de los animales transgénicos es más magra porque el exce-

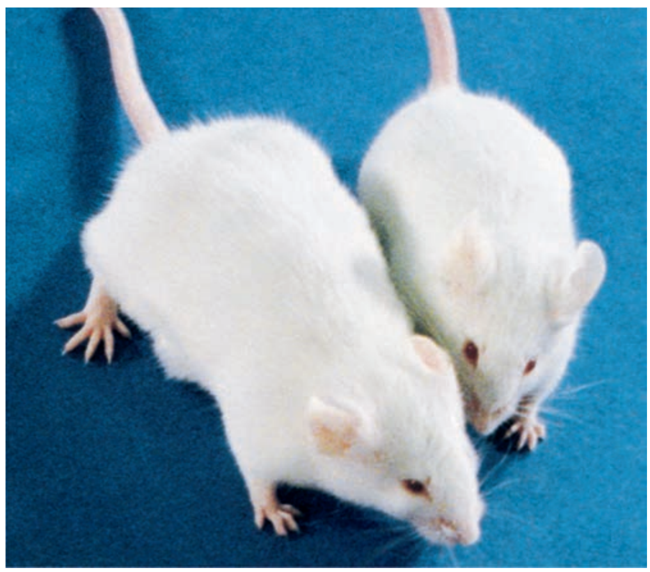


**FIGURA 18-48 Ratones transgénicos.** Esta fotografía muestra un par de compañeros de camada a la edad de 10 semanas. El ratón más grande se desarrolló a partir de un huevo que había sido inyectado con DNA que contenía el gen de la hormona de crecimiento de rata colocado corriente abajo de un promotor de metalotioneína. El ratón más grande pesa 44 g; el control más pequeño, no inyectado, pesa 29 g. El gen de la rata GH se transmitió a la descendencia que también creció más que los controles.

FUENTE: Cortesía de Ralph L. Brinster, from work reported in R. D. Palmiter *et al*., Nature 300:611, 1982. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

so de hormona de crecimiento estimula la conversión de nutrientes en proteínas en lugar de grasas.

## Plantas transgénicas

Las plantas también son candidatos principales para la ingeniería genética. Los investigadores han demostrado que se pueden cultivar las plantas completas a partir de células vegetales cultivadas individuales. Esto brinda la oportunidad de alterar la composición genética de las plantas mediante la introducción de DNA en los cromosomas de las células cultivadas que posteriormente pueden convertirse en plantas maduras. Una forma de introducir los genes extraños es incorporarlos en el *plásmido Ti* de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Fuera del laboratorio, esta bacteria vive en asociación con las plantas dicotiledóneas, donde causa la formación de bultos tumorales llamados agallas de corona. Durante una infección, una sección del plásmido Ti denominada *región T-DNA* se pasa de la bacteria a la célula vegetal. Esta parte del plásmido se incorpora a los cromosomas de la célula vegetal e induce a la célula a proliferar y proporcionar nutrientes para la bacteria.

El plásmido Ti puede aislarse de las bacterias y unirse a los genes extraños para producir un plásmido recombinante que se recoge en el cultivo por las células de las plantas dicotiledóneas no diferenciadas, incluidas las de zanahorias y tabaco. La **FIGURA 18-49** muestra el uso de los plásmidos Ti recombinantes para introducir DNA extraño en las células meristemas en la punta de los brotes recién formados. Los brotes se pueden enraizar y cultivar en plantas maduras. Esta técnica, que se llama *transformación T-DNA*, se ha utilizado para transformar células vegetales con genes derivados de las bacterias que codifican toxinas que matan a los insectos, protegiendo así a las plantas de los insectos depredadores.

Se han desarrollado otros procedimientos para introducir genes extraños en las células de plantas monocotiledóneas. En uno de los enfoques más exóticos, las células vegetales pueden servir como blancos para precipitados microscópicos de tungsteno recubiertos con DNA disparados por una "pistola de genes". Esta técnica se ha utilizado para alterar genéticamente varios tipos diferentes de células vegetales.

Las dos actividades más importantes que los genetistas de plantas podrían mejorar mediante ingeniería genética son la fotosíntesis y la fijación del nitrógeno, ambas funciones bioenergéticas cruciales. Cualquier mejora significativa en la eficiencia fotosintética significaría grandes aumentos en la producción de cultivos. Se espera que se pueda diseñar una versión modificada de la enzima fijadora de $CO_2$ que sea menos susceptible a la fotorrespiración (página 216). La fijación del nitrógeno es una actividad realizada por ciertos géneros de bacterias (por ejemplo, *Rhizobium*) que viven en una relación simbiótica con ciertas plantas (por ejemplo, soja, cacahuate, alfalfa y guisante). Las bacterias residen en las inflamaciones, o los *nódulos leguminosos*, ubicados en las raíces, donde eliminan el $N_2$ de la atmósfera, lo reducen a amoniaco y entregan el producto a las células de la planta. Los genetistas están buscando una forma de aislar los genes involucrados en esta actividad del genoma bacteriano e introducirlos en los cromosomas de las plantas no leguminosas que actualmente dependen en gran medida del fertilizante agregado para sus compuestos nitrogenados reducidos. Alternativamente, podría ser posible alterar el genoma de una planta o una bacteria para que puedan desarrollarse nuevos tipos de relaciones simbióticas.

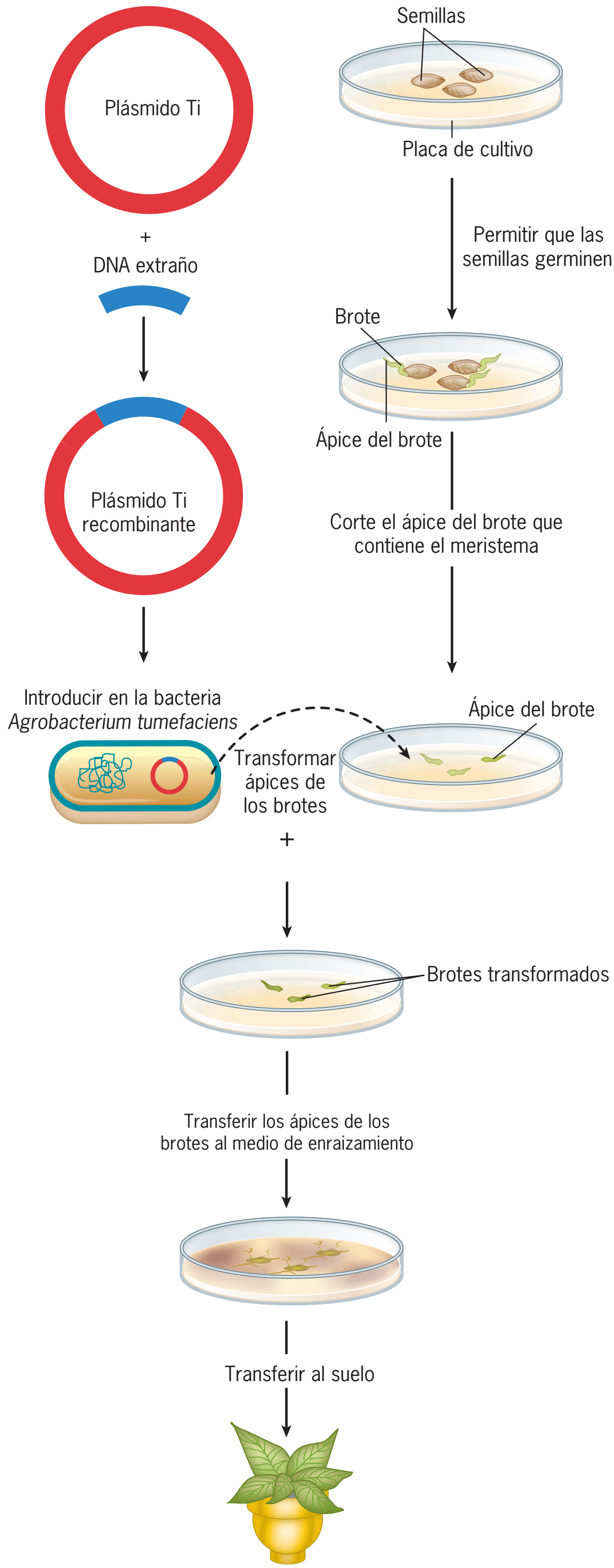



**FIGURA 18-49 Formación de plantas transgénicas utilizando el plásmido Ti.** El transgén se empalma en el DNA del plásmido Ti, que se reintroduce en las bacterias huésped. Las bacterias que contienen el plásmido recombinante se utilizan para transformar las células vegetales, en este caso, las células del meristema en la punta de un vértice del tallo disecado. Los brotes transformados se transfieren a un medio de selección donde desarrollan raíces. Las plantas enraizadas pueden ser transferidas a la tierra de las macetas.

## 18.25 Edición genética y silenciamiento

Hasta hace poco, los investigadores descubrieron nuevos genes y se enteraron de su función al detectar mutantes que presentaban fenotipos anormales (véase sección 8.2 sobre el estudio de la secreción de proteínas). Fue sólo a través del proceso de mutación

aleatoria que la existencia de los genes se hizo evidente. Este proceso de aprendizaje sobre los genotipos mediante el estudio de los fenotipos mutantes se conoce como *genética avanzada*. Desde el desarrollo de las técnicas para la generación de los genes y la secuenciación del DNA, los investigadores han podido identificar y estudiar los genes directamente sin saber nada sobre la función de su proteína codificada. Esta condición se ha vuelto especialmente familiar en los últimos años con la secuenciación de genomas completos y la identificación de miles de genes cuya función sigue siendo desconocida. Durante las últimas dos décadas, los investigadores han desarrollado medios para llevar a cabo la *genética inversa*, un proceso para determinar el fenotipo (es decir, la función) basado en el conocimiento del genotipo. El enfoque básico de la genética inversa es eliminar la función de un gen específico y luego determinar qué efecto tiene la eliminación de esa función en el fenotipo. Primero consideraremos cómo los investigadores introducen mutaciones específicas en los genes *in vitro*, luego analizaremos dos técnicas ampliamente utilizadas para eliminar la función de los genes *in vivo*.

## Mutagénesis *in vitro*

Como es evidente a lo largo de este libro, el aislamiento de mutantes naturales ha desempeñado un papel importantísimo en la determinación de la función de los genes y sus productos. Pero las mutaciones naturales son eventos raros, y no es factible usar tales mutaciones para estudiar el papel de determinados residuos de aminoácidos en la función de una proteína en particular. En lugar de esperar a que aparezca un organismo con un fenotipo inusual e identificar la mutación responsable, los investigadores pueden mutar el gen (o sus regiones reguladoras asociadas) de la forma deseada y observar el cambio fenotípico resultante. Estas técnicas, denominadas colectivamente *mutagénesis in vitro*, requieren que el gen, o al menos el segmento del gen que se va a mutar, haya sido clonado.

Un procedimiento desarrollado por Michael Smith de la Universidad de British Columbia llamado **mutagénesis dirigida** (**SDM**, *site-directed mutagenesis*) permite a los investigadores realizar cambios muy pequeños y específicos en una secuencia de DNA, como la sustitución de una base por otra, o la eliminación o inserción de un número muy pequeño de bases. Por lo general, la SDM se logra sintetizando primero un oligonucleótido de DNA que contiene el cambio deseado, permitiendo que este oligonucleótido se hibride con una preparación de un solo linaje del DNA normal y luego use el oligonucleótido como cebador para la DNA polimerasa. La polimerasa alarga el cebador al agregar nucleótidos que son complementarios al DNA normal. El DNA modificado se puede clonar y el efecto de la alteración genética puede determinarse introduciendo el DNA en una célula huésped apropiada. Los científicos suelen utilizar la SDM para hacer preguntas muy específicas sobre la función de un gen o proteína. Por ejemplo, podrían cambiar un aminoácido por otro para comprender mejor el papel de ese sitio específico en la función general de una proteína. Alternativamente, podrían introducir pequeños cambios en la región reguladora de un gen y determinar el efecto sobre la expresión génica. Si la intención de la mutagénesis dirigida al sitio es simplemente eliminar la función de un gen, se pueden usar métodos menos específicos. Por ejemplo, cortar una secuencia de genes en un sitio de restricción, usar la DNA polimerasa para hacer que las regiones de una sola cadena de los extremos pegajosos se conviertan en DNA de doble cadena y luego unir esos extremos de nuevo puede destruir el marco de lectura de una proteína. En otros casos, un fragmento de restricción completo podría eliminarse del gen.

Construir una mutación *in vitro* es sólo un aspecto de la genética inversa. Para estudiar el efecto de una mutación de ingeniería en el fenotipo, es necesario sustituir el alelo mutante por el gen normal en el organismo en cuestión. El desarrollo de una técnica para introducir mutaciones en el genoma del ratón abrió la puerta a los estudios genéticos inversos en mamíferos y revolucionó el estudio de la función de los genes de los mamíferos.

## Ratones knockout

Hemos descrito en muchos lugares de este texto los fenotipos de ratones que carecen de una copia funcional de un gen en particular. Por ejemplo, se observó que los ratones que carecen de una copia funcional del gen *p53* invariablemente desarrollan tumores malignos (sección 16.7). Estos animales, que se llaman **ratones knockout**, pueden proporcionar una visión única de la base genética de una enfermedad humana, así como una base para estudiar las diversas actividades celulares en las que podría participar el producto de un gen en particular. Los ratones knockout nacen como resultado de una serie de procedimientos experimentales representados en la **FIGURA 18-50**.

Los diversos procedimientos utilizados para generar ratones knockout fueron desarrollados en la década de 1980 por Mario Capecchi en la Universidad de Utah, Oliver Smithies en la Universidad de Wisconsin y Martin Evans en la Universidad de Cambridge. El primer paso es aislar un tipo de célula inusual que tiene virtualmente poderes ilimitados de diferenciación. Estas células, llamadas **células madre embrionarias** (página 18), se encuentran en el blastocisto de los mamíferos, en una etapa temprana del desarrollo embrionario comparable a la etapa de blástula de otros animales. Un blastocisto de mamífero (figura 18-50) está compuesto de dos partes distintas. La capa exterior constituye el *trofectodermo*, que da lugar a la mayoría de las membranas extraembrionarias características de un embrión de mamífero. La superficie interna del trofectodermo entra en contacto con un grupo de células llamadas *masa celular interna* que se proyecta en la cavidad espaciosa (el blastocoel). La masa celular interna da origen a las células que forman el embrión. La masa celular interna contiene las células madre embrionarias (ES, *embryonic stem*), que se diferencian en todos los diversos tejidos de los que está compuesto un mamífero.

Las células ES se pueden aislar de los blastocistos y cultivar *in vitro* en condiciones donde las células crecen y proliferan. Las células ES se transfectan luego con un fragmento de DNA que contiene un alelo mutante no funcional del gen que se eliminará, así como genes de resistencia a antibióticos que se pueden usar para seleccionar las células que han incorporado el DNA alterado en su genoma. De aquellas células que absorben el DNA, aproximadamente una de cada $10^4$ se somete a un proceso de *recombinación de homólogos* en la que el DNA transfectado reemplaza la secuencia de DNA homóloga. Mediante el uso de este procedimiento, las células ES que son heterocigotas para el gen en cuestión se producen y luego se seleccionan en función de su resistencia a los antibióticos. En el siguiente paso, varias de estas células ES del donante se inyectan en el blastocoel de un embrión de ratón receptor. En el protocolo representado en la figura 18-50, el embrión receptor se obtiene de una cepa negra. El embrión inyectado se implanta luego en el oviducto de un ratón hembra que ha sido preparado hormonalmente para llevar el embrión a término. A medida que el embrión se desarrolla en su madre sustituta, las células ES inyectadas se unen a la propia masa celular interna del embrión y contribuyen a la formación de tejidos embrionarios, incluidas las células germinales de las gónadas. Estos ratones quiméricos pueden reconocerse porque su pelaje contiene características de las cepas tanto del donante como del receptor. Para determinar si las células germinales también contienen la mutación knockout, los ratones quiméricos se aparean con un miembro de una cepa negra consanguínea. Si las células germinales contienen la mutación knockout, la descendencia será heterocigótica para el gen en todas sus células. Los heterocigotos pueden distinguirse por su coloración de pelaje marrón. Estos heterocigotos se unen entre sí para producir descendientes que son homo-

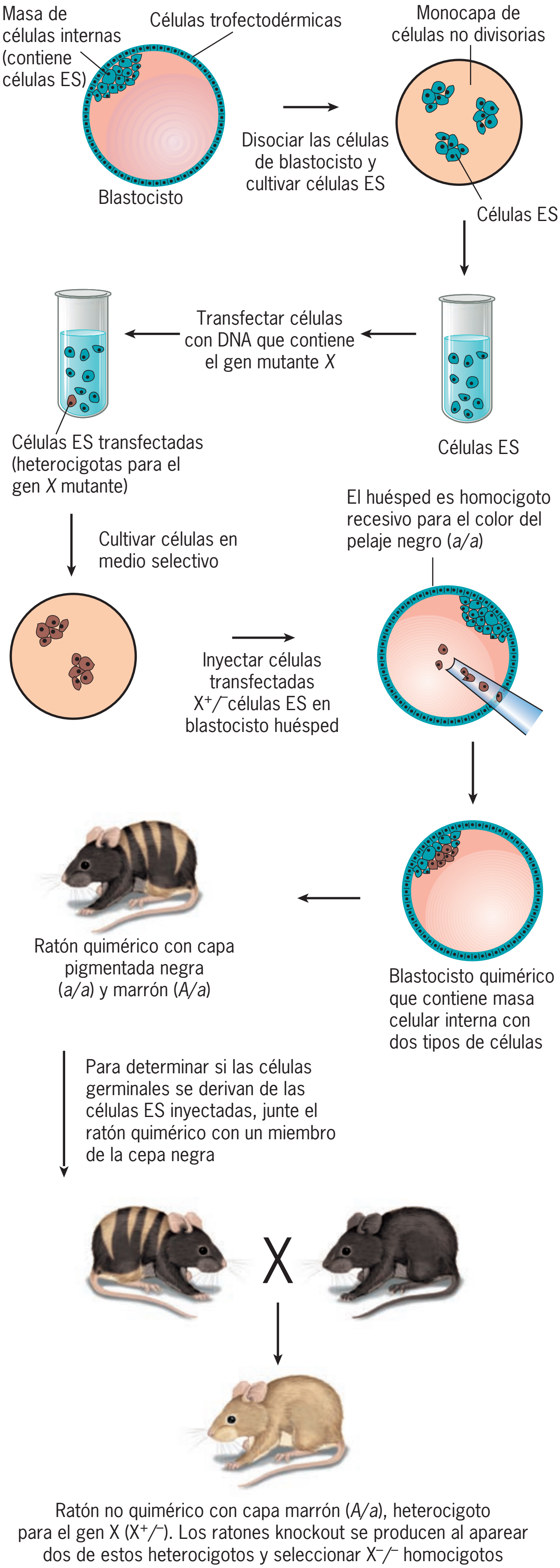



**FIGURA 18-50 Formación de ratones knockout.** Los pasos se describen en el texto.

cigotos para el alelo mutante. Estos son los ratones knockout que carecen de una copia funcional del gen. Algún gen dentro del genoma, o cualquier secuencia de DNA para esa materia, puede alterarse en cualquier forma deseada utilizando este enfoque experimental.

En algunos casos, la eliminación de un gen en particular puede llevar a la ausencia de un proceso en particular, lo que proporciona evidencia convincente de que el gen es esencial para ese proceso. Sin embargo, a menudo, la eliminación de un gen que se cree que participa en un proceso esencial causa poca o ninguna alteración en el fenotipo del animal. Tales resultados pueden ser difíciles de interpretar. Es posible, por ejemplo, que el gen no esté involucrado en el proceso que se está estudiando o, como suele ser el caso, la ausencia del producto del gen se compensa con el producto de un gen completamente diferente. La compensación de un gen por otro puede verificarse produciendo ratones que carecen de los dos genes en cuestión (es decir, un doble knockout).

En otros casos, la ausencia de un gen conduce a la muerte del ratón durante el desarrollo temprano, lo que también dificulta la determinación del papel del gen en la función celular. Los investigadores a menudo pueden solucionar este problema utilizando una técnica que permite que un gen en particular se desactive en uno o varios tejidos deseados, mientras que el gen se expresa en el resto del animal. Estos *knockouts condicionales*, como se les llama, permiten a los investigadores estudiar el papel del gen en el desarrollo o la función del tejido afectado. Un objetivo actual del Consorcio Internacional de Ratones Knockout es generar knockouts condicionales de cada gen en el genoma del ratón.

## Interferencia de RNA

Los ratones knockout han sido una estrategia invaluable para aprender sobre la función de los genes, pero la generación de estos animales es laboriosa y costosa. En los últimos años, una nueva técnica en el campo de la genética inversa se ha generalizado. Como se discutió en la sección 11.10, la interferencia del RNA (RNAi) es un proceso en el cual un mRNA específico se degrada debido a la presencia de un pequeño siRNA de doble cadena cuya secuencia está contenida dentro de la secuencia del mRNA. Las funciones de los genes de las plantas, los nematodos o las moscas de la fruta se pueden estudiar simplemente introduciendo un siRNA en uno de estos organismos por diversos medios y examinando el fenotipo del organismo que resulta del agotamiento del mRNA correspondiente. La determinación de las funciones de los genes a nivel celular, en lugar de a nivel del organismo, se puede lograr mediante el estudio de los efectos de estos mismos siRNA en las actividades de las células cultivadas. Usando estos enfoques, los investigadores pueden recopilar información sobre las funciones de una gran cantidad de genes en un periodo relativamente corto. Como se explica en la página 432, el RNAi se puede usar para estudiar la función de los genes en las células de los mamíferos incubando las células con pequeños dsRNA encapsulados en los lípidos o mediante la ingeniería genética de las células para producir los propios siRNA. Una vez dentro de la célula, el siRNA guía la degradación del mRNA blanco, dejando a la célula incapaz de producir proteínas adicionales codificadas por ese gen. Cualquier deficiencia en el fenotipo de la célula puede atribuirse a una reducción marcada en el nivel de la proteína que se está investigando. Como en el caso de los genes knockouts, la ausencia de un fenotipo después del tratamiento con un siRNA no significa necesariamente que el gen en cuestión no esté involucrado en un proceso particular, ya que otro gen puede ser capaz de compensar la ausencia de expresión de ese gen que es el blanco.

Las bibliotecas que contienen miles de siRNA, o vectores que contienen DNA que codifica estos RNA, también están disponibles para el estudio de la función de los genes en varios organismos modelo y en células humanas. Los investigadores que utili-

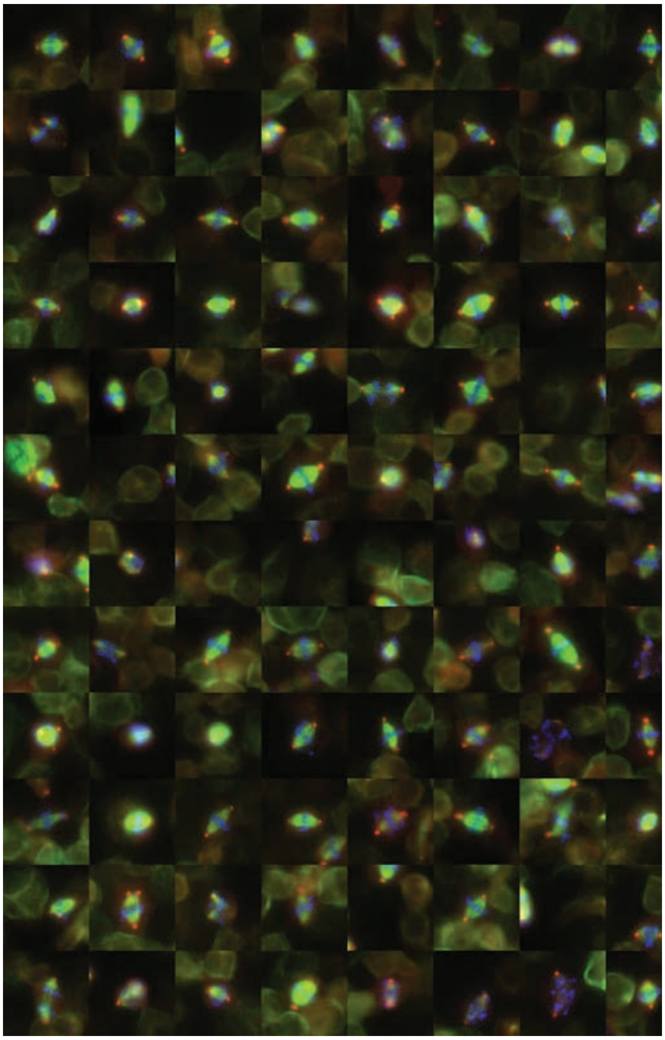


**FIGURA 18-51 Determinación de la función del gen por la interferencia del RNA.** La figura muestra una galería de imágenes de inmunofluorescencia de células de *Drosophila* cultivadas que se han incubado con varios siRNA de doble cadena. Las células que se muestran aquí se habían acumulado en la metafase de la mitosis como resultado de un tratamiento separado que bloqueaba la progresión a la anafase. Durante el curso de este estudio, se examinaron más de 4 millones de células. Fue posible detectar un número tan grande de células haciendo que una computadora seleccionara las imágenes de las células que estaban en la metafase y luego recortara y ensamblara las imágenes en paneles como se muestra en esta fotografía. Luego, las imágenes podrían ser examinadas para detectar la presencia de los husos mitóticos anormales, ya sea por los observadores humanos o por análisis computarizados utilizando programas diseñados para detectar características específicas de un huso anormal. (Se puede encontrar un estudio aún más grande del mismo tipo en *Nature* 464: 721, 2010).

FUENTE: Cortesía de Gohta Goshima y Ronald D. Vale.

zan estas bibliotecas pueden estudiar los efectos de la eliminación de la expresión de un gen en prácticamente cualquier proceso celular. Debería ser posible, por ejemplo, determinar qué genes están involucrados en el ensamblaje del huso mitótico tratando las células con una biblioteca de siRNA de todo el genoma y luego seleccionando todas las células tratadas en el momento de la división celular para detectar la presencia de un huso mitótico anormal. La **FIGURA 18-51** muestra una galería de imágenes de células de *Drosophila* cultivadas en la etapa metafásica de la mitosis. Cada una de las células representadas en esta galería había sido tratada con un siRNA dirigido contra un gen diferente en el genoma de *Drosophila*. En este estudio se probaron más de 14 000 siRNA diferentes, de los cuales aproximadamente 200 causaron que las células tratadas tuvieran un huso de la metafase anormal. Más de la mitad de los siRNA que afectaron el ensamblaje del huso mitótico se dirigieron a genes que no se sabía que estaban involucrados en la formación de esta estructura, lo que proporciona nuevos conocimientos sobre las funciones de los mismos.

## Edición del genoma utilizando nucleasas de ingeniería

Como se discutió en el capítulo 13, las células poseen varios sistemas para reconocer y reparar rápidamente el daño en el DNA. Cuando se producen roturas de la doble cadena (DSB, *double-stranded breaks*) en el DNA, los extremos libres están unidos por enzimas y se vuelven a unir. La reparación puede suceder simplemente pegando los dos extremos libres juntos mediante un proceso conocido como unión final no homóloga (página 534), o mediante una dirección dirigida por homología en la que se utiliza una pieza homóloga de DNA como plantilla para guiar el proceso de reparación.

Durante la última década, los investigadores han desarrollado varias estrategias que utilizan las DSB y reparan las enzimas para realizar cambios específicos en el genoma de una célula u organismo. En términos generales, todas las técnicas implican hacer una DSB en una secuencia blanco específica utilizando una nucleasa diseñada. Dependiendo de las condiciones experimentales, una serie de resultados son posibles, incluida la inserción, eliminación o alteración de la secuencia.

El desafío clave de esta técnica ha sido crear nucleasas capaces de reconocer las secuencias blanco específicas y escindir eficazmente el DNA sólo en ese lugar. Las primeras nucleasas modificadas por ingeniería, llamadas nucleasas de dedos de zinc (ZFN, *zinc-finger nucleases*) se construyeron utilizando el dominio de reconocimiento del DNA de las proteínas con dedos de zinc fusionadas a una nucleasa no específica. Las diferentes secuencias del DNA podrían ser seleccionadas variando el orden, el número y el tipo de módulos de dedos de zinc utilizados en la ZFN. Los TALEN se desarrollaron posteriormente utilizando un módulo diferente de proteína de reconocimiento del DNA, pero siguieron un diseño similar.

Una nueva técnica de edición del genoma, llamada CRISPR, ha tomado el campo de la edición del genoma por asalto desde que se caracterizó por primera vez en 2012 por los laboratorios de Jennifer Doudna (Universidad de California, Berkeley) y Emmanuelle Charpentier (Universidad de Umea) y se puso a trabajar en células de mamíferos por el laboratorio de Feng Zhang (Instituto Amplio). CRISPR se descubrió por primera vez por su papel en la inmunidad innata bacteriana, como se explica en la sección 11.13. Cuando las bacterias y las arqueas están expuestas a los fagos, algunas especies toman segmentos del DNA del fago y los incorporan en su propio genoma. El DNA puede luego transcribirse en RNA e incorporarse a una proteína conocida como Cas9, una nucleasa que utiliza las secuencias cortas de los fagos en su RNA como plantilla para identificar y destruir el DNA de los fagos que encuentra en la célula a través de la introducción de DSB. Los grupos de Doudna y Charpentier descubrieron que al introducir los RNA diseñados por el laboratorio en Cas9, podrían diseñar la nucleasa para identificar y cortar el DNA de secuencia arbitraria con alta especificidad y eficiencia *in vitro* (**FIGURA 18-52**). En los años posteriores a este descubrimiento, se ha demostrado que el sistema CRISPR funciona en numerosos sistemas modelo, incluidas las células humanas cultivadas y los organismos adultos completos (véase el **video del tutorial experimental: edición del genoma utilizando CRISPR** para este capítulo). Si bien las investigaciones actuales se están moviendo rápidamente hacia el desarrollo de CRISPR como un método para tratar enfermedades genéticas en los seres humanos, todavía hay muchas preguntas (tanto éticas, como se explica en el capítulo de apertura, y técnicas) que aún no se han abordado.

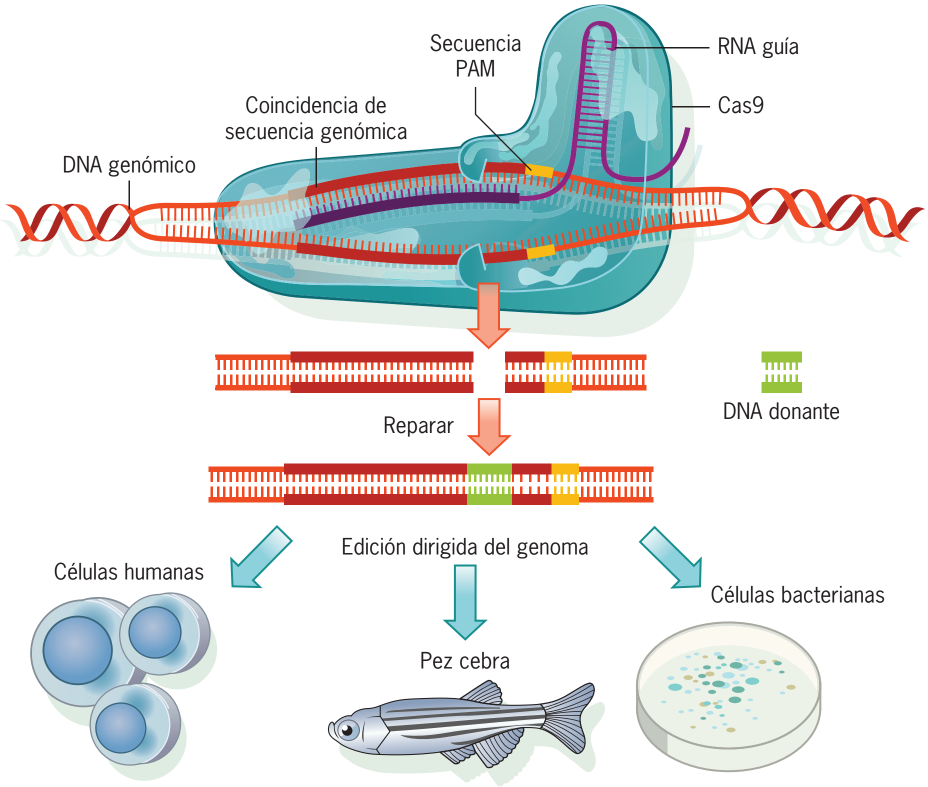



**FIGURA 18-52 Descripción general de la técnica CRISPR de edición del genoma.** Cas9 (azul) utiliza un RNA guía (púrpura) que puede reconocer y un par de bases con una secuencia genómica objetivo (cadenas rojas gruesas), Cas9 también requiere una secuencia corta, conocida como secuencia PAM (naranja), corriente abajo para la secuencia objetivo. Al encontrar una secuencia coincidente, Cas9 corta ambas cadenas de DNA objetivo, lo que resulta en una ruptura de la doble cadena que se repara rápidamente por las enzimas reparadoras de DNA. CRISPR se puede usar para editar, eliminar o agregar nuevo DNA a una ubicación específica en el genoma.

FUENTE: De Jennifer A. Doudna, *Nature* 495:50-51, 2013. Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

## 18.26 El uso de los anticuerpos

Como se discutió en el capítulo 17, los anticuerpos (o inmunoglobulinas) son proteínas producidas por los tejidos linfoides en respuesta a la presencia de materiales extraños o antígenos. Una de las propiedades más notables de los anticuerpos, y una que los hace tan útiles para los investigadores biológicos, es su notable especificidad. Una célula puede contener miles de proteínas diferentes, sin embargo, una preparación de anticuerpos se une sólo a aquellas moléculas seleccionadas dentro de la célula que tienen una pequeña parte que encaja en los sitios de unión a los antígenos de las moléculas de anticuerpos. A menudo se pueden obtener anticuerpos que distinguen entre dos polipéptidos que difieren en un solo aminoácido o en una única modificación postraduccional (como en la página 496).

Los biólogos han aprovechado los anticuerpos durante mucho tiempo y han desarrollado una amplia variedad de técnicas que involucran su uso. Hay básicamente dos enfoques diferentes para la preparación de las moléculas de anticuerpos que interactúan con un antígeno dado. En el enfoque tradicional, un animal (un conejo o una cabra) se inyecta repetidamente con el antígeno, y después de un periodo de varias semanas, se extrae sangre que contiene los anticuerpos deseados. La sangre completa se trata para eliminar las células y los factores de coagulación y producir un **antisuero**, que se analiza para determinar su título de anticuerpos y del cual se pueden purificar las inmunoglobulinas. Aunque este método de producción de anticuerpos sigue en uso, tiene ciertas desventajas inherentes. Debido al mecanismo de la síntesis de anticuerpos, un animal produce una variedad de diferentes especies de inmunoglobulinas, es decir, inmunoglobulinas con diferentes regiones V en sus cadenas polipeptídicas, incluso cuando son desafiadas con una preparación de antígeno altamente purificada. Un antisuero que contiene una variedad de inmunoglobulinas que se unen al mismo antígeno se dice que es *policlonal*. Debido a que las inmunoglobulinas son demasiado similares en estructura para ser fraccionadas, resulta imposible obtener una preparación de una sola especie de anticuerpo purificado mediante esta técnica.

En 1975, Cesar Milstein y Georges Köhler, del Consejo de Investigación Médica de Cambridge, Inglaterra, llevaron a cabo una serie de experimentos de gran alcance que llevaron a la preparación de anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos. Para entender su trabajo, es necesario desviarse brevemente. Un clon dado de las células productoras de anticuerpos (que se deriva de un solo linfocito B) sintetiza anticuerpos que tienen sitios de combinación para antígenos idénticos. La heterogeneidad de los anticuerpos producidos cuando se inyecta un único antígeno purificado en un animal se produce por el hecho de que muchos linfocitos B diferentes se activan, cada uno de los cuales tiene anticuerpos unidos a la membrana con una afinidad por una parte diferente del antígeno. Surgió una pregunta importante: ¿era posible sortear este problema y obtener una única especie de molécula de anticuerpo? Considere por un momento los resultados de un procedimiento en el que uno inyecta un animal con un antígeno purificado, espera un periodo de semanas para que se produzcan los anticuerpos, elimina el bazo u otros órganos linfoides, prepara una suspensión de células individuales, aísla las células que producen el anticuerpo deseado, y hace crecer estas células particulares como colonias separadas para obtener grandes cantidades de esta inmunoglobulina particular. Si se siguiera este procedimiento, se debería obtener una preparación de moléculas de anticuerpos producidas por una única colonia (o clon) de células, lo que se conoce como un **anticuerpo monoclonal**. Pero

las células productoras de anticuerpos no crecen y se dividen en el cultivo, por lo que se tuvo que introducir una manipulación adicional para obtener anticuerpos monoclonales.

Las células malignas de mieloma son un tipo de célula cancerosa que crece rápidamente en el cultivo y produce grandes cantidades de anticuerpos. Pero las células de mieloma son de poca utilidad como herramientas analíticas porque no se forman en respuesta a un antígeno particular. En cambio, las células de mieloma se desarrollan a partir de la conversión aleatoria de un linfocito normal al estado maligno y, por tanto, producen el anticuerpo que el linfocito en particular estaba sintetizando antes de que se convirtiera en maligno.

Milstein y Köhler combinaron las propiedades de estos dos tipos de células, el linfocito productor normal de anticuerpos y la célula de mieloma inmortal. Lograron esta hazaña fusionando los dos tipos de células para producir células híbridas, llamadas **hibridomas**, que crecen y proliferan indefinidamente, produciendo grandes cantidades de un solo anticuerpo (monoclonal). El anticuerpo producido es uno que estaba siendo sintetizado por los linfocitos normales antes de la fusión con la célula de mieloma.

El procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales se ilustra en la **FIGURA 18-53**. El antígeno (ya esté presente en una forma soluble o como parte de una célula) se inyecta en el ratón para causar la proliferación de las células específicas formadoras de anticuerpos (paso 1, figura 18-53). Después de un periodo de varias semanas, el bazo se extirpa y se disocia en células individuales (paso 2), y los linfocitos productores de anticuerpos se fusionan con una población de células de mieloma maligno (paso 3), lo que hace que las células híbridas sean inmortales, es decir, capaces de la división celular ilimitada. Las células híbridas (hibridomas) se seleccionan de células no fusionadas colocando la mezcla de células en un medio en el que sólo los híbridos pueden sobrevivir (paso 4). Luego, los hibridomas se cultivan clonalmente en pocillos separados (paso 5) y se analizan de forma individual para determinar la producción de anticuerpos contra el antígeno que se está estudiando. Las células híbridas que contienen el anticuerpo apropiado (etapa 6) se pueden clonar *in vitro* o *in vivo* (creciendo como células tumorales en un animal receptor), y se pueden preparar cantidades ilimitadas del anticuerpo monoclonal. Una vez que se han producido los hibridomas, se pueden almacenar indefinidamente en estado congelado y se pueden poner alícuotas a disposición de los investigadores de todo el mundo. Una de las características más importantes de esta metodología es que no es necesario comenzar con un antígeno purificado para obtener un anticuerpo. De hecho, el antígeno contra el cual se busca el anticuerpo monoclonal puede ser incluso un componente menor de toda la mezcla.

Una vez que una preparación de moléculas de anticuerpo está en la mano, ya sea obtenida por técnicas inmunológicas convencionales o por formación de hibridomas, estas moléculas pueden usarse como sondas altamente específicas en una variedad de técnicas analíticas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse en la purificación de proteínas. Cuando se agrega un anticuerpo purificado a una mezcla cruda de proteínas, la proteína específica que se busca se combina selectivamente con el anticuerpo y precipita de la solución. Los anticuerpos también pueden usarse junto con varios tipos de procedimientos de fraccionamiento para identificar una proteína particular (antígeno) entre una mezcla de proteínas. En una *transferencia Western*, por ejemplo, una mezcla de proteínas se fracciona primero por electroforesis en gel bidimensional (como en la figura 18-31). Las proteínas fraccionadas se transfieren luego a una lámina de filtro de nitrocelulosa, que luego se incuba con una preparación de anticuerpos que se han marcado de forma radiactiva o fluorescente. La ubicación en el filtro de la proteína específica unida por el anticuerpo se puede determinar a partir de la ubicación de la unión a la radiactividad o la fluorescencia.

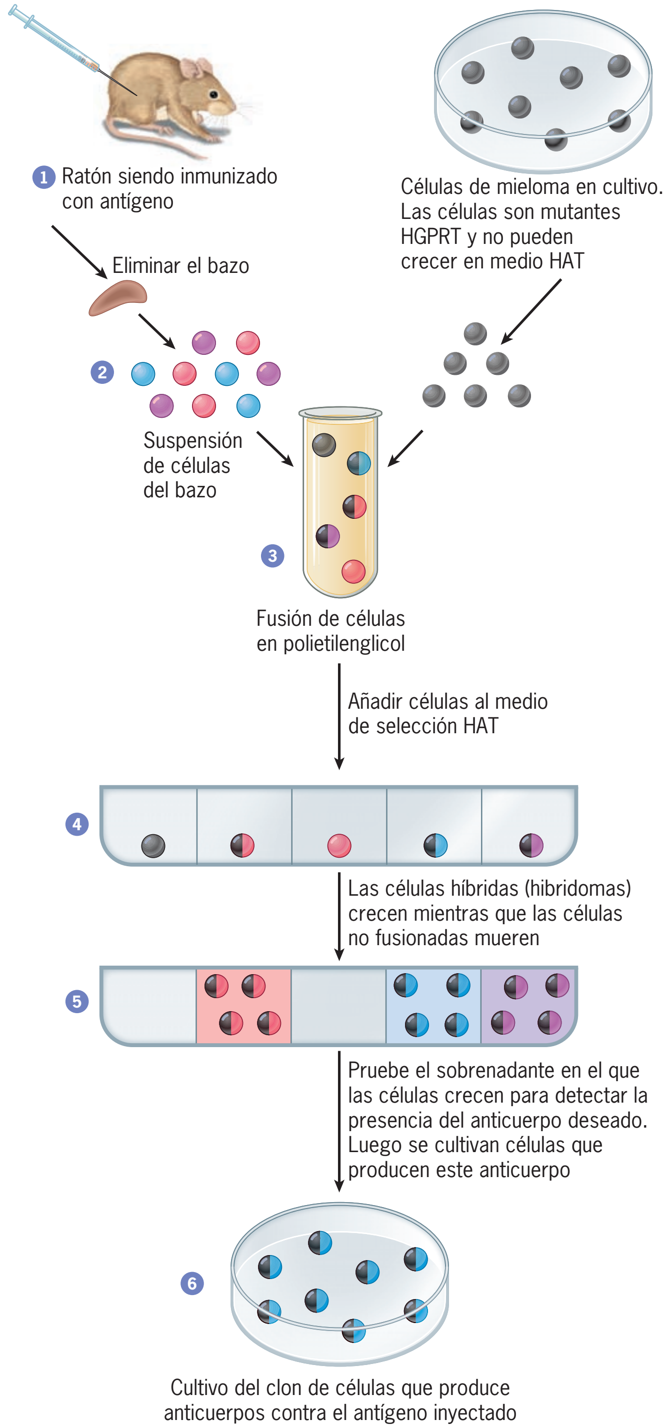



**FIGURA 18-53 Formación de anticuerpos monoclonales.** Los pasos se describen en el texto. El medio HAT se llama así porque contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. Este medio permite que crezcan las células con una hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPR, *thypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*) funcional, pero no apoya el crecimiento de células que carecen de esta enzima, como las células del mieloma no fusionadas utilizadas en este procedimiento.

Además de su uso en la investigación, los anticuerpos monoclonales desempeñan un papel valioso en la medicina de diagnóstico en las pruebas para determinar la concentración de proteínas específicas en la sangre u orina. En un ejemplo, los anticuerpos monoclonales forman la base de ciertas pruebas de embarazo caseras que monitorean la presencia de una proteína (gonadotropina coriónica) que aparece en la orina unos días después de la concepción. Los anticuerpos monoclonales también se han vuelto muy útiles como agentes terapéuticos para tratar enfermeda-

des humanas (página 655). Hasta la fecha, los esfuerzos para desarrollar hibridomas humanos que producen anticuerpos monoclonales humanos no han tenido éxito. Para sortear este escollo, los ratones han sido diseñados genéticamente para que los anticuerpos que producen sean cada vez más humanos en la secuencia de aminoácidos. Varios de estos anticuerpos monoclonales humanizados han sido aprobados para el tratamiento de varias enfermedades. Más recientemente, los ratones han sido diseñados para que su sistema inmunológico sea esencialmente de naturaleza "humana". Estos animales producen anticuerpos que son completamente humanos en su estructura.

El primer anticuerpo completamente humano (Humira), aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide (página 669), se produjo mediante una técnica muy diferente que utiliza los bacteriófagos en lugar de los hibridomas como base para la producción de anticuerpos monoclonales. La técnica se conoce como *visualización de fagos*. En esta técnica, se generan miles de millones de partículas de fagos diferentes en las que cada fago porta un gen que codifica una molécula de anticuerpo humano que posee una región variable única (página 679). Diferentes fagos dentro de esta vasta biblioteca codifican diferentes anticuerpos, es decir, anticuerpos con diferentes regiones variables. En cada caso, el gen del anticuerpo se fusiona con un gen que codifica una de las proteínas de la cubierta viral, de modo que cuando el fago se ensambla dentro de una célula huésped, la molécula de anticuerpo se muestra en la superficie de la partícula viral. Supongamos que se tiene una proteína (antígeno) que se cree sería un buen objetivo para un anticuerpo terapéutico en particular. El antígeno se purifica y se le permite interactuar con una muestra de cada uno de los miles de millones de partículas de fagos que forman la biblioteca de fagos. Aquellos fagos que se unen al antígeno con alta afinidad se pueden identificar y permitir que se multipliquen en una célula huésped apropiada. Una vez que se ha amplificado de esta manera, el DNA que codifica el gen del anticuerpo se puede aislar y usar para transfectar una célula de mamífero apropiada. Las células modificadas genéticamente pueden crecer en grandes cultivos para producir cantidades terapéuticas del anticuerpo. La producción de los anticuerpos cultivados en las células de los mamíferos es una empresa costosa y se están buscando "fábricas vivientes" alternativas. Entre las alternativas consideradas para este propósito están las cabras, conejos y células de tabaco.

Un escaneo rápido a través de este texto revelará numerosas micrografías que muestran la inmunolocalización de una proteína particular dentro de una célula como se visualiza en el microscopio óptico o electrónico. La inmunolocalización de proteínas dentro de una célula depende del uso de anticuerpos que se han preparado contra esa proteína en particular. Una vez preparadas, las moléculas de anticuerpo se unen (conjugan) a una sustancia que las hace visibles bajo el microscopio, pero no interfiere con la especificidad de sus interacciones. Para su uso con el microscopio óptico, los anticuerpos generalmente se complejizan con pequeñas moléculas fluorescentes, como la fluoresceína o la rodamina, para generar derivados que luego se incuban con las células o secciones de las células. Los sitios de unión se visualizan entonces con el microscopio de fluorescencia. Esta técnica se llama **inmunofluorescencia directa**. A menudo es preferible llevar a cabo la localización del antígeno mediante una variación de esta técnica llamada **inmunofluorescencia indirecta**. En la inmunofluorescencia indirecta, las células se incuban con un anticuerpo *no marcado*, que deja formar un complejo con el antígeno correspondiente. La ubicación de la pareja antígeno-anticuerpo se revela luego en un segundo paso utilizando una preparación de anticuerpos marcados con fluorescencia, cuyos sitios de combinación se dirigen contra las moléculas de anticuerpo utilizadas en el primer paso. La inmunofluorescencia indirecta da como resultado una imagen más brillante porque numerosas moléculas de anticuerpos secundarios pueden unirse a un único anticuerpo primario. La inmunofluorescencia indirecta también tiene una ventaja práctica; el anticuerpo conjugado (fluorescente) se compra fácilmente a los vendedores. La inmunofluorescencia proporciona una claridad notable porque sólo las proteínas unidas por el anticuerpo se revelan al ojo; todos los materiales sin marcar permanecen invisibles. La localización de los antígenos en el microscopio electrónico se realiza mediante el uso de los anticuerpos que se han marcado con materiales densos en electrones, como la proteína ferritina que contiene hierro o las partículas de oro. Un ejemplo de esta técnica se muestra en la figura 8-23*c*, *d*).

# Glosario

*Aquí se definen muchos términos y conceptos clave. Los números entre paréntesis que siguen a la mayoría de las definiciones identifican el capítulo y la sección en la que el término se define por primera vez. Por ejemplo, un término seguido de (3.2) se define por primera vez en el capítulo 3, sección 2: "Enzimas". Los términos definidos en los ensayos de la Perspectiva humana o Vías experimentales se identifican entre paréntesis con HP o EP. Por ejemplo, un término seguido de (EP1) se define por primera vez en el ensayo de Vías experimentales del capítulo 1.*

## A

**Aceites** Las grasas que son líquidas a temperatura ambiente. (2.7)

**Aceptor primario de electrones** Molécula que recibe el electrón fotoexcitado desde los pigmentos del centro de reacción en ambos fotosistemas. (6.5)

**Ácido** Una molécula que es capaz de liberar un ion de hidrógeno. (2.4)

**Ácido desoxirribonucleico (DNA)** Un ácido nucleico de doble hebra compuesto por dos cadenas poliméricas de nucleótidos que contienen desoxirribosa. (2.18)

**Ácido graso** Cadena larga de hidrocarburos no ramificada con un solo grupo de ácido carboxílico en un extremo. (2.7)

**Ácido ribonucleico (RNA)** Un ácido nucleico de hebra simple, compuesto por una cadena polimérica de nucleótidos que contienen ribosa. (2.18)

**Ácidos grasos insaturados** Aquellos que tienen uno o más dobles enlaces entre los átomos de carbono. (2.7)

**Ácidos grasos saturados** Aquellos que carecen de enlaces dobles entre los carbonos. (2.7)

**Acoplamiento excitación-contracción** Los pasos que vinculan la llegada de un impulso nervioso a la membrana plasmática del músculo con el acortamiento de los sarcómeros en la profundidad de la fibra muscular. (9.12)

**Actina** Proteína citoesquelética globular que se polimeriza para formar un filamento helicoidal flexible, capaz de interactuar con la miosina. Los filamentos de actina proporcionan soporte mecánico para las células eucariotas, determinan la forma de la célula y permiten los movimientos celulares. (9.10)

**Actividad específica** El cociente entre la cantidad de una proteína de interés y la cantidad total de proteína presente en una muestra, que se utiliza como medida de purificación. (18.11)

**Adenosín trifosfato (ATP)** Nucleótido que consiste en adenosina unida a tres grupos fosfato; es la principal fuente de energía inmediata para células procariotas y eucariotas. (2.18)

**Adhesiones focales** Estructuras adhesivas características de las células cultivadas que se adhieren a la superficie de una placa de cultivo. La membrana plasmática en la región de la adhesión focal contiene grupos de integrinas, que conectan el material extracelular que recubre la placa de cultivo al sistema de microfilamento que contiene actina del citoesqueleto. (7.6)

**Aerobios** Organismos que dependen de la presencia de oxígeno para metabolizar compuestos ricos en energía. (5.1)

**Agente oxidante** La sustancia en una reacción redox que se reduce, causando la oxidación de la otra sustancia. (3.9)

**Agente reductor** La sustancia en una reacción redox que se oxida, causando que la otra sustancia se reduzca. (3.9)

**Aislantes** Secuencias de frontera especializadas que "recortan" un promotor y su potenciador de otros elementos promotores/potenciadores. Según un modelo, las secuencias aislantes se unen a las proteínas de la matriz nuclear. (12.15)

**Ajuste inducido** El cambio conformacional en una enzima después de que el sustrato se ha unido, y que permite que la reacción química continúe. (3.6)

**Alelos** Formas alternativas del mismo gen. (10.1)

**Almidón** Mezcla de dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, que sirve como energía química disponible con facilidad en la mayoría de las células vegetales. (2.6)

**Aminoacil-tRNA sintetasa (aaRS)** Una enzima que enlaza de forma covalente los aminoácidos a los extremos 3′ de su(s) tRNA análogo(s). Cada aminoácido es reconocido por una aminoacil-tRNA sintetasa específica. (11.15)

**Anaerobios** Organismos que utilizan compuestos ricos en energía a través de vías metabólicas independientes del oxígeno, como la glucólisis y la fermentación. (5.1)

**Anafase** La etapa de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas se separa una de la otra. (14.10)

**Anafase A** El movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la mitosis. (14.10)

**Anafase B** Alargamiento del huso mitótico, que hace que los dos polos del huso se separen aún más. (14.10)

**Análisis de la composición de la base** Las cantidades relativas de cada base en varias muestras de DNA. (10.5)

**Análisis de ubicación de todo el genoma** Un método para mapear los sitios de unión de un factor de transcripción dado, aislando físicamente todas las secuencias de DNA en el genoma que están unidas a un factor particular, sondeando después qué secuencias de DNA están presentes. (12.13)

**Anfipática** La propiedad biológicamente importante de una molécula que tiene ambas regiones, hidrófobas e hidrófilas. (2.7, 4.2)

**Angstrom (Å)** Unidad equivalente a 0.1 nm, utilizada para describir las dimensiones atómicas y moleculares. (1.7)

**Animales transgénicos** Animales que han sido diseñados genéticamente para que sus cromosomas contengan genes extraños. (18.24)

**Anión** Un átomo o molécula ionizada con una carga neta negativa. (2.1)

**Antena** Las moléculas de captación de luz de una unidad fotosintética, que absorben fotones de diversas longitudes de onda y transfieren la energía a las moléculas de pigmento en el centro de reacción. (6.5)

**Anticodón** Una secuencia de tres nucleótidos en cada tRNA que funciona en el reconocimiento del codón del mRNA complementario. (11.15)

**Anticuerpo** Una proteína de inmunoglobulina producida por células plasmáticas derivadas de linfocitos B, que interactúa con la superficie de un patógeno o sustancia extraña para facilitar su destrucción. (17.1)

**Anticuerpo monoclonal** Una preparación de moléculas de anticuerpo producidas a partir de una única colonia (o clon) de células. (18.26)

**Antígeno** Cualquier sustancia reconocida por un sistema inmunológico como extraña al organismo. (17.2)

**Antiporte** Un modo de transporte de membrana en el que una especie transportada se mueve a través de la membrana en

una dirección, junto con el movimiento de una especie diferente a través de la membrana en la dirección opuesta (4.14)



**Antisuero** Fluido que contiene anticuerpos deseados, que permanecen después de la eliminación de las células y los factores de coagulación de la sangre completa que ha sido expuesta a un antígeno dado. (18.26)

**Apoptosis** Un tipo de muerte celular ordenada o programada, en la cual la célula responde a ciertas señales iniciando una respuesta normal que lleva a la muerte de la célula. La muerte por apoptosis se caracteriza por la compactación general de la célula y su núcleo, la disección ordenada de la cromatina en pedazos a manos de una endonucleasa especial que divide el DNA, y la rápida deglución de la célula moribunda por fagocitosis. (15.17)

**Artefacto** Una estructura vista en una imagen microscópica que resulta de la coagulación o precipitación de materiales que no tenían existencia en la célula viva. (18.5)

**Artritis reumatoide** Una afección causada por la destrucción progresiva del tejido articular por una cascada de respuestas autoinmunes inflamatorias. (17.3)

**Áster** Arreglo tipo "rayos solares" de microtúbulos alrededor de cada centrosoma durante la mitosis. (14.7)

**Átomo electronegativo** El átomo con mayor fuerza atractiva; el átomo que puede capturar la mayor parte de los electrones de un enlace covalente. (2.1)

**Átomos de cobre de la cadena de transporte de electrones** Un tipo de portador de electrones; estos átomos están ubicados dentro de un complejo proteico único de la membrana mitocondrial interna que acepta y dona un solo electrón, ya que alternan entre los estados $Cu^{2+}$ y $Cu^{1+}$. (5.4)

**ATP sintasa** La enzima sintetizadora de ATP de la membrana mitocondrial interna, con pieza de cabeza $F_1$ y pieza basal $F_0$, esta última incrustada en la propia membrana. (5.7)

**Autoanticuerpos** Anticuerpos capaces de reaccionar con los propios tejidos del cuerpo. (17.2)

**Autoensamblaje** La propiedad de las proteínas (u otras estructuras) para asumir la conformación correcta (nativa) basada en el comportamiento químico dictado por la secuencia de aminoácidos. (2.12)

**Autofagia** La destrucción de los orgánulos y su reemplazo, durante el cual un orgánulo está rodeado por una doble membrana. La membrana que rodea el orgánulo se fusiona con un lisosoma. (8.15)

**Autorradiografía** Una técnica para visualizar procesos bioquímicos, al permitir que un investigador determine la ubicación de los materiales marcados radiactivamente dentro de una célula. Las secciones de tejido que contienen isótopos radiactivos se cubren con una capa delgada de emulsión fotográfica, que se expone por la radiación que emana del tejido. Los sitios en las células que contienen radiactividad se revelan bajo el microscopio por los granos de plata después del desarrollo de la emulsión suprayacente. (8.2, 18.8)

**Autótrofo** Organismo capaz de sobrevivir con el $CO_2$ como su principal fuente de carbono. (6.1)

**Axón** Una extensión única y prominente que emerge del cuerpo celular y conduce los impulsos salientes lejos del cuerpo celular y hacia las células objetivo. (4.16)

**Axonema** El núcleo central que contiene microtúbulos de un cilio o flagelo. La mayoría de los axonemas consisten en nueve dobletes periféricos, dos microtúbulos centrales y numerosas estructuras accesorias. (9.7)

## B

**Balsas lipídicas** Microdominios dentro de una membrana celular que poseen una fluidez disminuida debido a la presencia de colesterol, glicolípidos y fosfolípidos que contienen ácidos grasos saturados más largos. Una residencia propuesta de proteínas ancladas a GPI y proteínas de señalización (4.6)

**Base** Cualquier molécula que sea capaz de aceptar un ion hidrógeno. (2.4)

**Bibliotecas de DNA** Colecciones de fragmentos de DNA clonados. Las bibliotecas normalmente se dividen en genómicas y bibliotecas de cDNA. (18.23)

**Bicapa lipídica** Fosfolípidos autoensamblados en una estructura bimolecular basada en interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas; biológicamente importante como el núcleo de organización de las membranas celulares. (4.1)

**Bioenergética** El estudio de los diversos tipos de transformaciones de energía que ocurren en los organismos vivos. (3.1)

**Bivalente** (**tétrada**) El complejo formado durante la meiosis por un par de cromosomas homólogos sinapsados. (14.13)

**Buffers** Compuestos que pueden interactuar con el hidrógeno libre o con los iones hidroxilo, minimizando un cambio en el pH. (2.4)

## C

**Cadena lateral o grupo R** El grupo funcional definitorio de un aminoácido, que puede ir desde un solo hidrógeno hasta unidades polares complejas o no polares, en los 20 aminoácidos que se encuentran más comúnmente en las células. (2.8)

**Cadena ligera** La más pequeña de los dos tipos de cadenas polipeptídicas en un anticuerpo, con una masa molecular de 23 kDa. (17.7)

**Cadena pesada** Uno de los dos tipos de cadenas polipeptídicas en un anticuerpo, usualmente con una masa molecular de 50 a 70 kDa. (17.7)

**Cadena polipeptídica** Un polímero no ramificado largo y continuo, formado por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos covalentes. (2.8)

**Cadherinas** Una familia de glicoproteínas emparentadas que median en la adhesión celular-celular dependiente del $Ca^{2+}$. (7.7)

**Calmodulina** Una pequeña proteína de unión al calcio que está ampliamente distribuida. Cada molécula de calmodulina contiene cuatro sitios de enlace para el calcio. (15.14)

**Cambio conformacional** Un movimiento predecible dentro de una molécula, asociado con la actividad biológica. (2.10)

**Canal de compuerta** Un canal de iones que puede cambiar la conformación entre una forma abierta a su ion soluto y una cerrada al ion; dichos canales pueden ser activados por voltaje, por compuestos químicos, o mecánicamente, en dependencia de la naturaleza del proceso que desencadena el cambio en la conformación. (4.11)

**Canal de compuerta de voltaje** Un canal de iones que se abre o se cierra en respuesta a cambios en el voltaje a través de una membrana. (4.11)

**Canal de compuerta mecánica** Un canal de membrana que se abre o cierra en respuesta a fuerzas mecánicas, como la tensión en la membrana. (4.11)

**Canal de ligando-compuerta** Un canal de membrana que se abre o cierra en respuesta al enlace de una molécula a su superficie. (4.11)

**Canal iónico** Estructura transmembranosa (por ejemplo, una proteína integral con un poro acuoso) permeable a un ion o iones específicos. (4.11)

**Carbohidratos** (**glicanos**) Moléculas orgánicas que incluyen azúcares simples (monosacáridos) y polímeros multisacáridos, que sirven mayormente como componentes de almacenamiento de energía y compuestos estructurales en las células. (2.6)

**Cariotipo** Imagen en la que los cromosomas homólogos pareados se ordenan en tamaño decreciente. (12.5)

**Cascada Ras-MAP cinasa** Una cascada que se activa en respuesta a una amplia variedad de señales extracelulares, y desempeña un papel clave en la regulación de actividades vitales como la proliferación y diferenciación celular. (15.11)

**Caspasas** Una familia de cisteínas proteasas que se activan en una etapa temprana de la apoptosis, y son responsables de los eventos de degradación observados durante la muerte celular. (15.17)

**Catión** Un átomo o molécula ionizada con una carga positiva adicional. (2.1)

**Cebador (iniciador, primer)** La cadena de DNA o RNA que proporciona DNA polimerasa con el terminal 3'OH necesario. (13.2)

**Célula asesina natural** (**NK**) Un tipo de linfocito que se involucra en un ataque no específico en una célula huésped infectada, conduciendo a la apoptosis. (17.1)

**Célula postsináptica** Una célula que recibe neurotransmisores de otra célula a través de una sinapsis. (4.18)

**Célula presináptica** Una célula que envía neurotransmisores a otra célula a través de una sinapsis. (4.18)

**Células dendríticas** (**DC**) Células presentadoras de antígenos que interactúan con las células T y B para activar una respuesta inmune. (17.6)

**Células eucariotas** Células (por ejemplo, vegetales, animales, protistas, hongos) caracterizadas por una estructura interna basada en orgánulos como el núcleo, derivado de *eu-karyon* o núcleo verdadero. (1.3)

**Células madre** Células situadas en diversos tejidos del cuerpo que constituyen una población de reserva capaz de dar origen a las diversas células de ese tejido. Las células madre se pueden definir como células no diferenciadas, capaces de 1) auto-renovación, es decir, producir células tales como ellas mismas, y 2) la diferenciación en dos o más tipos de células maduras. (HP 1.6)

**Células madre de cáncer** Células que se cree existen en algunos tumores, y que son responsables de mantener el tumor y permitirle que se propague. (16.17)

**Células madre embrionarias** (**ES**) Un tipo de célula que posee poderes virtualmente ilimitados de diferenciación, se encuentra en el blastocisto de los mamíferos y es una etapa temprana del desarrollo embrionario, comparable a la blástula de otros animales. (HP 1.6, 18.25)

**Células madre hematopoyéticas (HSC)** Células que se encuentran principalmente en la médula ósea, capaces de auto-renovarse y dar origen a todos los tipos de células sanguíneas. (HP 1.6)

**Células plasmáticas** Células diferenciadas de manera terminal que se desarrollan a partir de linfocitos B, que sintetizan y secretan grandes cantidades de anticuerpos transmitidos por la sangre. (17.2)

**Células presentadoras de antígenos (APC)** Células que muestran porciones de antígenos proteicos en su superficie. Las porciones se derivan por proteólisis de antígenos más grandes. Los péptidos antígenos se muestran en conjunto con las moléculas MHC. Prácticamente cualquier célula del cuerpo puede funcionar como una APC al mostrar péptidos en combinación con moléculas MHC de clase I, lo que proporciona un mecanismo para la destrucción de las células infectadas. En contraste los macrófagos, las células dendríticas y las células B, se conocen como APC "profesionales" porque funcionan para ingerir materiales, procesarlos y mostrarlos a las células TH en combinación con las moléculas MHC de clase II. (17.6)

**Células procariotas** Células estructuralmente simples, que incluyen arqueas y bacterias que no poseen orgánulos unidos por membrana; derivado de *pro-karyon*, o "antes del núcleo". (1.3)

**Celulosa** Polímero de glucosa no ramificada con enlaces β (1→4) que se ensambla en cables y sirve como un elemento estructural principal de las paredes celulares de las plantas. (2.6)

**Centrifugación diferencial** Una técnica utilizada para aislar un orgánulo particular en grandes cantidades, que depende del principio de que mientras sean más densos que el medio circundante, las partículas de diferente tamaño y forma viajan hacia el fondo de un tubo de centrífuga a diferentes velocidades cuando se colocan en un campo centrífugo. (18.10)

**Centriolos** Estructuras cilíndricas de aproximadamente 0.2 μm de ancho, y usualmente alrededor del doble de largo, que contienen nueve fibrillas espaciadas uniformemente, cada una de las cuales aparece en sección transversal como una banda de tres microtúbulos. Los centriolos se encuentran casi siempre en pares, con cada uno de los miembros en ángulo recto entre sí. (9.5)

**Centrómero** Muesca muy notable en un cromosoma mitótico que sirve como sitio de formación del cinetocoro. (12.5)

**Centros de organización de microtúbulos (MTOC)** Una variedad de estructuras especializadas que desempeñan un papel en el inicio de la formación de microtúbulos. (9.5)

**Centrosoma** Una estructura compleja que contiene dos centriolos en forma de barril, rodeados por un material pericentriolar (o PCM) amorfo y denso en electrones, donde los microtúbulos se nuclean. (9.5, 14.7)

**Chaperonas moleculares** Varias familias de proteínas cuya función es asistir al plegamiento y ensamblaje de proteínas mediante la prevención de interacciones no deseadas. (2.12, EP2.14)

**Ciclo Calvin** (o **ciclo Calvin-Benson**) La ruta para la conversión de $CO_2$ en carbohidratos; el ciclo ocurre en las cianobacterias y en todas las células eucariotas de fotosíntesis. (6.9)

**Ciclo celular** Las etapas a través de las cuales una célula pasa de una división celular a la siguiente. (14.1)

**Ciclo de Krebs** Un nombre alternativo para el ciclo TCA. (5.2)

**Ciclo del ácido cítrico** Un nombre alternativo para el ciclo TCA. (5.2)

**Ciclo del ácido tricarboxílico** (**ciclo TCA**) La vía metabólica circular que oxida el acetil CoA, conservando su energía; el ciclo también se conoce como ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. (3.9, 5.2)

**Cilios** Orgánulos móviles con forma de pelo que se proyectan desde la superficie de diversas células eucariotas. Los cilios tienden a aparecer en grandes cantidades en la superficie de una célula. (9.7)

**Cinasas dependientes de ciclina (Cdk)** Enzimas que controlan la progresión de las células a través del ciclo celular. (14.4)

**Cinasas proteína-tirosina no receptoras** cinasas citoplasmáticas que fosforilan residuos específicos de tirosina en proteínas selectas. (15.10)

**Cinasas receptoras proteína-tirosina** (o **RTK**) Receptores de la superficie celular que, después de la unión del ligando, pueden fosforilar los residuos de tirosina en sí mismos, y/o en sustratos citoplasmáticos. Están involucrados principalmente en el control del crecimiento y diferenciación celular. (15.10)

**Cinesina** Una proteína motora dirigida al extremo 'plus' (+) que mueve las vesículas membranosas y otros orgánulos a lo largo de

los microtúbulos a través del citoplasma. La cinesina es un miembro de una familia de **proteínas cinesina-relacionadas** (**KRP**). (9.3)

**Cinética** El estudio de la velocidad de las reacciones químicas. (3.7)

**Cinetocoro** Una estructura en forma de botón situada en la superficie exterior del centrómero, a la que se unen los microtúbulos del huso. (14.7)

**Cisterna** Uno de los numerosos sacos de membrana aplanados que comprenden el aparato de Golgi. (8.3)

**CisteRNA *cis*** Las cisteRNA del complejo de Golgi más cercanas al retículo endoplásmico. (8.9)

**CisteRNA mediales** Compartimientos del aparato de Golgi que se encuentran en el centro del órgano, entre las cisteRNA *cis* y *trans*. (8.9)

**CisteRNA *trans*** Los compartimientos del aparato de Golgi que albergan la catálisis de las modificaciones tardías de las proteínas, y suelen ser distales del núcleo y del retículo endoplásmico. (8.9)

**Citocinesis** La parte del ciclo celular durante la cual se produce la división física de la célula en dos células hijas. (14.1)

**Citocromo oxidasa** Complejo enzimático que cataliza el paso final del transporte de electrones, al transferir electrones del citocromo *c* al oxígeno, consumiendo oxígeno y produciendo agua. (5.5)

**Citocromos** Un tipo de portador de electrones que consiste en una proteína unida a un grupo hemo. (5.4)

**Citoesqueleto** Una red interactiva elaborada compuesta por tres estructuras filamentosas bien definidas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Estos elementos funcionan para proporcionar soporte estructural; un marco interno responsable de colocar los diversos orgánulos dentro del interior de la célula; como parte de la maquinaria requerida para el movimiento de materiales y orgánulos dentro de las células; como elementos generadores de fuerza responsables del movimiento de las células de un lugar a otro; como sitios para anclar los RNA mensajeros y facilitar su traducción a polipéptidos; y como un transductor de señales, transmitiendo información desde la membrana celular al interior de la célula. (9.1)

**Citoquinas** Proteínas secretadas por células del sistema inmunológico que alteran el comportamiento de otras células inmunitarias. (17.6)

**Citosol** La región del contenido de líquido del citoplasma fuera de los orgánulos membranosos de una célula eucariota. (1.3)

**Clonación de DNA** Una técnica para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico, que generalmente implica el empalme del segmento en un vector de DNA y permite que el vector se replique dentro de una célula huésped bacteriana. (18.20)

**Clorofila** El pigmento fotosintético absorbente de luz más importante. (6.4)

**Clorofila centro de reacción** La molécula única de clorofila de los cientos o más en la unidad fotosintética que en realidad transfiere electrones a un aceptor de electrones. (6.5)

**Cloroplasto** Un orgánulo citoplásmico especializado unido a la membrana, sitio principal de la fotosíntesis en células eucariotas. (6.1)

**Coactivadores** Los intermediarios que ayudan a los factores de transcripción enlazados a estimular el inicio de la transcripción en el promotor central. (12.15)

**Código genético** Forma en que las secuencias de nucleótidos del DNA codifican la información para hacer productos proteicos. (11.14)

**Código histona** Un concepto de que el estado y la actividad de una región particular de la cromatina depende de las modificaciones covalentes específicas, o combinación de modificaciones, a las colas histonas de los nucleosomas en esa región. Las modificaciones son creadas por enzimas que acetilan, metilan y fosforilan varios residuos de aminoácidos dentro de las histonas centrales. (12.4)

**Codón de inicio** El triplete AUG, el sitio donde el ribosoma se une al mRNA para asegurar que el ribosoma se encuentre en el marco de lectura apropiado para leer correctamente el mensaje completo. (11.16)

**Codones** Secuencias de tres nucleótidos (tripletes de nucleótidos) en los mRNA que especifican aminoácidos. (11.14)

**Coeficiente de partición** La relación entre la solubilidad de un soluto en aceite y la del agua; es una medida de la polaridad relativa de una sustancia biológica. (4.10)

**Coenzima** Un componente orgánico, no proteico, de una enzima. (3.5)

**Cofactor** El componente no proteico de una enzima, puede ser inorgánico u orgánico. (3.5)

**Cohesina** Un complejo multiproteico que mantiene las cromátidas replicadas asociadas entre sí, hasta que se separan durante la división celular. (14.7)

**Cola poli(A)** Una cadena de residuos de adenosina en el extremo 3′ de un mRNA agregado pos-transcripcionalmente. (11.7)

**Colágenos** Una familia de glicoproteínas fibrosas conocida por su alta resistencia a la tracción, que funciona exclusivamente como parte de la matriz extracelular. (7.3)

**Colesterol** El esterol que se encuentra en células animales y puede constituir hasta la mitad del lípido en una membrana plasmática, con la proporción relativa en cualquier membrana afectando su comportamiento fluido. (4.2)

**Compactación de cromosomas** (**condensación de cromosomas**) Un proceso en el cual una célula convierte sus cromosomas en una estructura más corta y gruesa, que puede ser segregada durante la mitosis o meiosis. (14.7)

**Complejo de Golgi** Red de membranas lisas organizadas en una morfología característica, que consiste en cisteRNA aplanadas en forma de disco con bordes dilatados, y vesículas y túbulos asociados. El complejo de Golgi funciona principalmente como una planta de procesamiento, donde las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico se modifican de maneras específicas. (8.9)

**Complejo de poros nucleares** (**NPC**) Aparato complejo en forma de canasta, que llena el poro nuclear como un tapón y se proyecta hacia afuera, tanto hacia el citoplasma como al nucleoplasma. (12.2)

**Complejo de recolección de luz II** (**LHCII**) Complejo pigmento-proteína, ubicado fuera del propio fotosistema, que contiene la mayoría de los pigmentos de la antena que recolectan luz para el fotosistema II (PSII). También puede estar asociado con el fotosistema I (PSI). (6.6)

**Complejo de unión de exone**s (**EJC**) Un complejo de proteínas depositadas en los nucleótidos de transcripción 20-24 corriente arriba de la recién formada unión exón-exón. Este conglomerado de proteínas permanece con el mRNA hasta que se traduce. (11.18)

**Complejo enzima-sustrato** (**ES**) La asociación física entre una enzima y su sustrato (s), durante la cual se lleva a cabo la catálisis de la reacción. (3.5)

**Complejo multiproteico** La interacción de más de una proteína completa para formar un complejo funcional más grande. (2.11)

**Complejo principal de histocompatibilidad** (**MHC**) Una región del genoma que codifica las **proteínas MHC**. Los genes que codifican estas proteínas son altamente polimórficos, y están representados por un gran número de alelos diferentes. Estas diferencias genéticas entre humanos explican la tendencia de una persona a rechazar un trasplante de otra persona que no sea un gemelo idéntico. (17.10)

**Complejo sinaptonémico** (**SC**) Una estructura en forma de escalera compuesta por tres barras paralelas con muchas fibras cruzadas. El SC mantiene cada par de cromosomas homólogos en la posición adecuada para permitir la continuación de la recombinación genética entre las cadenas de DNA. (14.13)

**Complejos de remodelación de cromatina** Complejos de proteínas multisubunitarios que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para alterar la estructura de la cromatina y permitir la unión de factores de transcripción a sitios reguladores en el DNA. (12.15)

**Complementaria** Relación entre la secuencia de bases en las dos hebras de la doble hélice del DNA. Las restricciones estructurales en las configuraciones de las bases limitan la unión a los dos pares adenina-timina y guanina-citosina. (10.5)

**Complemento** Un sistema de proteínas de sangre y plasma que actúa como parte del sistema inmunitario innato para destruir los microorganismos invasores directamente (haciendo que su membrana plasmática sea porosa) o indirectamente (haciéndolos susceptibles a la fagocitosis). (17.1)

**Compuestos orgánicos (bioquímicos)** Compuestos sintetizados por organismos vivos. (2.5)

**Conducción saltadora** La propagación de un impulso nervioso cuando un potencial de acción desencadena otro en el tramo adyacente de la membrana desenvuelta (es decir, se propaga al hacer que los potenciales de acción salten de un nodo de Ranvier al siguiente). (4.17)

**Conductancia** El movimiento de pequeños iones a través de las membranas. (4.11)

**Conexona** Complejo multisubunitario de una unión gap formada por la agrupación dentro de la membrana plasmática de una proteína de membrana integral llamada conexina. Cada conexona se compone de seis subunidades de conexina dispuestas alrededor de una abertura central (o anillo) de más o menos igual diámetro. (7.12)

**Conformación** La disposición tridimensional de los átomos dentro de una molécula, a menudo importante para comprender la actividad biológica de las proteínas y otras moléculas en una célula viva. (2.9)

**Congresión** El movimiento de cromosomas duplicados a la placa metafásica durante la prometafase de la mitosis. (14.8)

**Cono de crecimiento** La punta distal de una neurona en crecimiento, que contiene la actividad locomotora requerida para la extensión axonal. (9.16)

**Constante de disociación** Una medida de la fuerza con que dos moléculas se pueden unir entre sí. (3.2)

**Constante de equilibrio de una reacción** (***Keq***) La relación entre las concentraciones de producto y las concentraciones de reaccionantes cuando la reacción está en equilibrio. (3.2)

**Constante de Michaelis** (**KM**) En la cinética de enzimas, el valor igual a la concentración de sustrato presente cuando la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. (3.7)

**Contraste** La diferencia de aspecto entre las partes adyacentes de un objeto, o un objeto y su fondo. (18.1)

**Control a nivel de procesamiento** Regulación de la vía mediante la cual se procesa una transcripción de RNA primaria en un RNA mensajero, que se puede traducir en un polipéptido. (12.9)

**Control de calidad** Las células contienen diversos mecanismos que garantizan que las proteínas y los ácidos nucleicos que sintetizan tengan la estructura adecuada. Por ejemplo, las proteínas mal plegadas se desplazan fuera del retículo endoplásmico y son destruidas por los proteasomas en el citosol; los mRNA que contienen codones de terminación prematura son reconocidos y destruidos, y el DNA que contiene anomalías (lesiones) es reconocido y reparado. (8.6)

**Control de nivel transcripcional** Determinación de si un gen en particular puede transcribirse y, si es así, que tan a menudo. (12.9)

**Control del nivel de traducción** Determinación de si un mRNA particular se traduce realmente y, si es así, con qué frecuencia y por cual periodo. (12.9)

**Control del nivel postraduccional** Regulación de la expresión génica después de la traducción, mediante el control de la actividad o la estabilidad de las proteínas. (12.9)

**Corrección de pruebas** El proceso de corrección de errores cometidos por una polimerasa después de haber incorporado un monómero. (11.2)

**Cotransporte** Un proceso que acopla el movimiento de dos solutos a través de una membrana, denominado *simporte* si los dos solutos se mueven en la misma dirección y *antiporte* si los dos se mueven en direcciones opuestas. (4.14)

**Crestas** Los muchos pliegues profundos característicos de la membrana mitocondrial interna, que contienen la maquinaria molecular de la fosforilación oxidativa. (5.1)

**CRISPR** Una vía de defensa basada en el RNA empleada por bacterias para defenderse de virus, que se ha convertido en una herramienta para diseñar genomas eucariotas (11.13)

**Cristalografía de rayos X** (o **difracción de rayos X)** Una técnica que bombardea los cristales de proteínas con un haz delgado de rayos X de una sola longitud de onda (monocromática). La radiación que es difractada por los electrones de los átomos de proteína golpea una placa fotográfica o un sensor. El patrón de difracción producido por el cristal está determinado por la estructura dentro de la proteína. (2.10, 18.16)

**Cromátidas** Miembros pareados de cromosomas mitóticos en forma de bastón, que juntos representan los cromosomas duplicados formados durante la replicación en la interfase previa. (14.7)

**Cromatina** Un material de nucleoproteína complejo que forma los cromosomas de las eucariotas. (1.3, 12.2)

**Cromatografía de afinidad** Técnica de purificación de proteínas que utiliza las propiedades estructurales únicas de una proteína que permiten que la molécula se extraiga específicamente de la solución, mientras que todas las demás moléculas permanecen en la solución. La solución se pasa a través de una columna en la que se inmoviliza una molécula interactiva específica (como un sustrato, ligando o antígeno) mediante un enlace a un material inerte (la matriz). (18.11)

**Cromatografía** Un término utilizado para una amplia variedad de técnicas en las que una mezcla de componentes disueltos se fracciona a medida que se mueve a través de algún tipo de matriz inmóvil. (18.11)

**Cromatografía de intercambio iónico** Una técnica para la purificación de proteínas en la que se utiliza la carga iónica para separar proteínas diferentes. (18.11)

**Cromosoma artificial bacteriano (BAC)** Vector de clonación capaz de aceptar grandes fragmentos de DNA extraño que se pueden clonar en bacterias. Consiste en un plásmido F con un origen de replicación, y los genes necesarios para regular la replicación. Los BAC han desempeñado un papel clave en la secuenciación del genoma. (18.23)

**Cromosomas** Hebras similares a filamentos, compuestas por el DNA nuclear de las células eucariotas y portadoras de la información genética. (10.2)



**Cromosomas artificiales de levadura (YAC)** Elementos de clonación que son versiones artificiales de un cromosoma de levadura normal. Contienen todos los elementos de un cromosoma de levadura necesarios para que la estructura se replique durante la fase S, y se segregue a las células hijas durante la mitosis, más un gen cuyo producto codificado permite seleccionar aquellas células que contienen el YAC de aquellas que carecen del mismo elemento y el fragmento de DNA a clonar. (18.23)

**Cromosomas homólogos** Cromosomas emparejados de células diploides, cada uno de los cuales lleva una de las dos copias del material genético que lleva ese cromosoma. (10.3)

**Cromosomas politeno** Cromosomas gigantes de insectos que contienen hebras duplicadas de DNA perfectamente alineadas, tantas como 1 024 veces el número de hebras de DNA de los cromosomas normales. (10.4)

**Cubierta de mielina** El material rico en lípidos que envuelve la mayoría de las neuronas en el cuerpo de los vertebrados. (4.16)

**Cuerpo basal** Una estructura que reside en la base del cilio o flagelo y que genera sus microtúbulos externos. Los cuerpos basales son idénticos en estructura a los centríolos. Ambos pueden dar lugar el uno al otro. (9.5)

**Cuerpos P** Gránulos citoplásmicos en los que el RNA se almacena o procesa para su degradación. (12.19)

**Cultivo celular** La técnica utilizada para crecer células fuera del organismo. (18.9)

**Cultivo primario** Cultivo de células obtenidas directamente del organismo. (18.9)

**Cultivo secundario** Transferencia de células previamente cultivadas a un medio de cultivo. (18.9)

## D

**Decapado por congelación** Técnica en la que el tejido se fractura congelado, y luego se expone brevemente al vacío para que una capa delgada de hielo se pueda evaporar arriba y debajo de las superficies fracturadas, lo que expone sus características para la identificación mediante microscopía electrónica. (18.5)

**Deleción** Una aberración cromosómica que se produce cuando falta una parte de un cromosoma. (12.6)

**Δ(pH) Diferencia de pH entre dos lados de una membrana** En el contexto de este capítulo, el delta pH se refiere a la diferencia de pH a través de la membrana interna mitocondrial. (5.6)

**Dendritas** Extensiones finas de los cuerpos celulares de la mayoría de las neuronas; las dendritas reciben información entrante de fuentes exteRNA, usualmente otras neuronas. (4.16)

**Deshidrogenasa** Una enzima que cataliza una reacción redox mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un reaccionante. (3.10)

**Desintegración mediada sin sentido (NMD)** Un mecanismo de vigilancia de mRNA que detecta los mRNA que contienen una terminación prematura de codones (sin sentido), y los conduce a su destrucción. (11.18)

**Desmosomas (maculae adherens)** Unión adhesiva en forma de disco que contiene cadherinas que se encuentran en una variedad de tejidos, pero sobre todo epiteliales, donde se localizan en la base de la unión adherente. En esta región placas citoplásmicas densas en la superficie interna de las membranas plasmáticas sirven como sitios de anclaje para enlazar filamentos intermedios que se extienden hacia el citoplasma. (7.9)

**Desnaturalización** Separación de la doble hélice del DNA en sus dos hebras componentes. (2.12, 10.8)

**Despolarización** Una disminución en la diferencia de potencial eléctrico a través de una membrana. (4.16)

**Diabetes tipo I** Trastorno autoinmune que resulta en la destrucción de células b secretoras de insulina en el páncreas. (17.3)

**Diferenciación** El proceso a través del cual las células no especializadas se vuelven más complejas y especializadas en estructura y función. (1.5)

**Difusión** El proceso espontáneo en el que una sustancia se mueve desde un área de mayor concentración a una de menor concentración, alcanzando finalmente la misma concentración en todas las áreas. (4.9)

**Difusión facilitada** Proceso mediante el cual la velocidad de difusión de una sustancia aumenta a través de la interacción con una proteína de membrana específica de la sustancia. (4.13)

**Dineína** Una proteína de motor multisubunidad excepcionalmente grande, portadora de carga, que se mueve a lo largo de los microtúbulos hacia su extremo (menos). Esta familia de proteínas se presenta como **dineínas citoplasmáticas** y **ciliares** o **dineínas axonémicas**. (9.3)

**Dineína ciliar** Una enorme proteína (hasta 2 millones de daltones [Da]), responsable de la conversión de la energía química de ATP en la energía mecánica de la locomoción ciliar. (HP9.8)

**Dineína citoplásmica** Una enorme proteína (masa molecular de más de 1 millón de daltones) compuesta por numerosas cadenas polipeptídicas. La molécula contiene dos grandes cabezas globulares que actúan como motores generadores de fuerza. La evidencia sugiere que la dineína citoplásmica funciona en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis, y también como un motor microtubular dirigido por el extremo (menos) para el movimiento de vesículas y orgánulos membranosos a través del citoplasma. (9.3)

**Diploide** Célula que contiene ambos miembros de cada par de cromosomas homólogos, como lo ejemplifica la mayoría de las células somáticas. Las células diploides se producen a partir de células parentales diploides durante la mitosis. Contrasta con las haploides. (10.10)

**División celular** El proceso por el cual las nuevas células se originan a partir de otras células vivas. (14.1)

**División celular asimétrica** División celular que produce dos células hijas no idénticas. (14.1)

**DNA girasa** Una topoisomerasa tipo II que puede cambiar el estado de súper enrollamiento en una molécula de DNA, aliviando la tensión que se acumula durante la replicación. Lo hace viajando a lo largo del DNA y actuando como pivote, cambiando el DNA súper enrollado positivamente en DNA súper enrollado negativamente. (13.2)

**DNA ligasa** La enzima responsable de unir fragmentos de DNA en una hebra continua. (13.2)

**DNA polimerasas** Las enzimas responsables de construir nuevas cadenas de DNA durante la replicación o reparación del DNA. (13.2)

**DNA recombinante** Moléculas de que contienen secuencias de DNA derivadas de más de una fuente. (18.20)

**DNA microsatélites** Secuencias cortas (1-9 pares de bases) presentes en pequeños grupos, de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud, que a menudo se encuentran dispersos en todo el genoma. (10.8)

**DNA minisatélites** Secuencias de 10-100 pares de bases encontradas en grupos que contienen hasta 3 000 repeticiones. (10.8)

**DNA satélites** Secuencias cortas (de 5 a 100 pares de bases de longitud) que forman grandes arreglos lineales en el genoma. (10.8)

**Dogma central** El concepto de que el DNA contiene la información para crear RNA, y el RNA contiene la información para producir proteínas. (11.1)

**Dolicol fosfato** Molécula hidrófoba formada por más de 20 unidades de isopreno, que ensamblan el segmento basal o núcleo de las cadenas de carbohidratos dentro de las glucoproteínas. (8.6)

**Dominio** Una región dentro de una proteína (o RNA) que se pliega y funciona de manera semi-independiente. (2.10)

**Dominio de poro** La parte de un canal de iones de compuerta de voltaje que forma un canal conductor de iones a través de la membrana. (4.11)

**Dominio PH** Un dominio de proteína que se enlaza a los anillos de inositol fosforilados de los fosfoinosítidos ligados a la membrana. (15.6)

**Dominio sensible al voltaje** La porción de un canal iónico de compuerta de voltaje que le permite responder al voltaje de la membrana. (4.11)

**Dominio transmembrana** La porción de una proteína de membrana que pasa a través de la bicapa lipídica, a menudo compuesta de aminoácidos no polares en una conformación α-helicoidal. (4.5)

**Duplicación** Una anomalía cromosómica en la que está presente una copia extra de una parte de un cromosoma. (12.6)

**Duplicación de genes** La duplicación de una pequeña porción de un solo cromosoma, por lo general mediante un proceso de intercambio desigual de segmentos. (10.10)

## E

**Edición RNA** Cambios que se realizan en la secuencia de una molécula de RNA después de que se haya transcrito, que convierten un nucleótido en otro. (12.18)

**Efector** Una sustancia que provoca una respuesta celular a una señal. (15.1)

**Electroforesis** Técnicas de fraccionamiento que dependen de la habilidad de las moléculas cargadas para migrar cuando se colocan en un campo eléctrico. (18.13)

**Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)** Técnica de fraccionamiento de proteínas, donde las proteínas son impulsadas por una corriente aplicada a través de un gel compuesto por una pequeña molécula orgánica (acrilamida), que está reticulada para formar un tamiz molecular. (18.13)

**Elementos de respuesta** Los sitios en los que factores de transcripción específicos se unen a las regiones reguladoras de un gen. (12.14)

**Elementos transponibles** Los segmentos de DNA que se mueven de un lugar en un cromosoma a un sitio completamente diferente; a menudo afectan la expresión génica. (10.11)

**Empalme RNA** El proceso de eliminar las secuencias intermedias de DNA (intrones) de un transcripto primario. (11.7)

**Endocitosis** Mecanismo para la captación de líquidos y solutos en una célula. Se puede dividir en dos tipos: endocitosis en fase masiva, que no es específica, y **endocitosis mediada por el receptor (RME)**, que requiere la unión de moléculas de soluto, como la LDL o la transferrina, a un receptor específico de superficie celular. (8.17)

**Endocitosis mediada por receptores (RME)** Mecanismo endocítico que requiere la unión de moléculas de soluto, como LDL o transferrina, a un receptor específico de la superficie celular. (8.17)

**Endonucleasas de restricción (o enzimas de restricción)** Nucleasas contenidas en las bacterias que reconocen secuencias cortas de nucleótidos dentro del DNA dúplex, y dividen el esqueleto en sitios altamente específicos en ambas hebras del dúplex. (18.20)

**Endosomas** Orgánulos de la vía endocítica. Los materiales absorbidos por la endocitosis se transportan a los **endosomas tempranos** donde se clasifican, y luego a los **endosomas tardíos**, y finalmente a los lisosomas. Los endosomas tardíos también funcionan como sitios de destino de las enzimas lisosomales transportadas desde el complejo de Golgi. (8.19)

**Energía** La capacidad de hacer trabajo y existe en dos formas: potencial y cinética. (3.1)

**Energía de activación** La energía cinética mínima necesaria para que un reaccionante experimente una reacción química. (3.5)

**Enfermedad de Graves** Enfermedad autoinmune de la tiroides, causada por la producción de anticuerpos que se unen al receptor de la hormona estimulante de la tiroides, lo que lleva a la estimulación y al hipertiroidismo. (17.3)

**Enfermedades autoinmunes** Enfermedades caracterizadas por un ataque del sistema inmunitario contra los tejidos del propio cuerpo. Incluye la esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina, y artritis reumatoide. (17.3)

**Enfermedades inflamatorias del intestino (IBD)** Una de diversas afecciones que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, caracterizadas por una inflamación dolorosa del intestino (17.3).

**Enlace amida** El enlace químico que se forma entre los ácidos carboxílicos y las aminas (o grupos funcionales ácidos y amino) al producir una molécula de agua. (2.5)

**Enlace covalente** El tipo de enlace químico en el que los pares de electrones se comparten entre dos átomos. (2.1)

**Enlace de hidrógeno** La interacción débil y atractiva entre un átomo de hidrógeno unido de forma covalente a un átomo electronegativo (por tanto, con una carga positiva parcial) y un segundo átomo electronegativo. (2.3)

**Enlace éster** El enlace químico que se forma entre los ácidos carboxílicos y los alcoholes (o grupos funcionales ácidos y alcohólicos) mientras producen una molécula de agua. (2.5)

**Enlace glicosídico** El enlace químico que se forma entre las moléculas de azúcar. (2.6)

**Enlace iónico** Un enlace no covalente que se produce entre iones de carga opuesta, también llamado puente salino. (2.3)

**Enlace no covalente** Un enlace químico relativamente débil basado en fuerzas atractivas entre regiones con carga opuesta dentro de una molécula, o entre dos moléculas cercanas. (2.3)

**Enlace peptídico** El enlace químico que une los aminoácidos en una proteína; se forma cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de un segundo aminoácido. (2.8)

**Entropía (S)** Una medida del desorden relativo del sistema o universo, asociado con los movimientos aleatorios de las sustancia. Dado que todos los movimientos cesan en el cero absoluto (0 K), la entropía es cero solo a esa temperatura. (3.1)

**Envoltura nuclear** La compleja estructura de doble membrana que divide el núcleo eucariota de su citoplasma. (12.2)

**Enzimas** Los catalizadores proteicos de vital importancia en las reacciones celulares. (3.5)

**Epítopo (o determinante antigénico)** Parte de un antígeno que se enlaza al sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo específico. (17.7)

**Esclerosis múltiple** Una enfermedad autoinmune causada por la destrucción de la vaina de mielina que rodea los axones de las neuronas. (17.3)

**Esfingolípidos** Una clase de lípidos de membrana (derivaciones de la esfingosina) que consisten en la esfingosina unida a un ácido graso por su grupo amino. (4.2)

**Espacio intermembrana** El espacio entre las membranas mitocondriales inteRNA y exteRNA. (5.1)

**Espacio luminal** (**cisternal**) La región de contenido líquido del citoplasma encerrado por las membranas del retículo endoplásmico, o complejo de Golgi. (8.3)

**Especificidad** La propiedad básica para la vida de la interacción selectiva entre componentes de una célula. (2.8)

**Espectro de absorción** Un gráfico de la intensidad de luz absorbida en función de su longitud de onda. (6.4)

**Espectro de acción** Una gráfica de la fracción relativa (o eficiencia) de un proceso producido por la luz de diferentes longitudes de onda. (6.4)

**Espectrofotómetro** Instrumento utilizado para medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica absorbe una disolución. Si se conocen las características de absorbancia de un tipo particular de molécula, entonces la cantidad de luz de la longitud de onda apropiada absorbida por una disolución de esa molécula proporciona una medida sensible de su concentración. (18.14)

**Espliceosoma** Un complejo macromolecular que contiene una variedad de proteínas y varias partículas de ribonucleoproteínas diferentes, que funcionan en la eliminación de intrones de un transcrito primario. (11.7)

**Esporofito** Una etapa diploide del ciclo de vida de las plantas, que comienza con la unión de dos gametos para formar un cigoto. Durante la etapa de esporofito se produce la meiosis, que produce esporas que germinan directamente en un gametofito haploide. (14.12)

**Estado básico** El estado no excitado de un átomo o molécula. (6.4)

**Estado de transición** El punto durante una reacción química en el que los enlaces se rompen y se reforman para producir productos. (3.5)

**Estado estacionario** Condición metabólica en la que las concentraciones de reactivos y productos son esencialmente constantes, aunque las reacciones individuales pueden no estar en equilibrio. (3.4)

**Estado excitado** La configuración electrónica de una molécula después de la absorción de un fotón que ha energizado un electrón para cambiarlo de un orbital interno a uno externo. (6.4)

**Estroma** Espacio fuera del tilacoide, pero dentro de la membrana interna relativamente impermeable de la envoltura del cloroplasto. (6.2)

**Estructura cuaternaria** La organización tridimensional de una proteína que consta de más de una cadena polipeptídica o subunidad. (2.11)

**Estudios de asociación de todo el genoma** (**GWAS**) Un estudio científico que busca descubrir si ciertas variantes genéticas están asociadas con un rasgo específico. (HP10.16)

**Eucromatina** Cromatina que retorna a su estado disperso durante la interfase. (12.4)

**Exocitosado** Haber sido sometido a exocitosis, o descargado fuera de la célula. (8.1)

**Exocitosis** El proceso de fusión de membrana y descarga de contenido durante el cual la membrana de un gránulo o vesícula secretora entra en contacto con la membrana de plasma suprayacente con la que se fusiona, formando así una abertura a través de la cual se puede liberar el contenido del gránulo o vesícula. (8.14)

**Exones** Aquellas partes de un gen dividido que contribuyen a un producto de RNA maduro. (11.6)

**Expresión génica** La producción de mRNA, y eventualmente de proteína por un gen dado. (11.1)

## F

**Factores de inicio** Proteínas solubles (IFs en bacterias y elFs en eucariotas) que hacen posible el inicio de la traducción. (11.16)

**Factores de transcripción** Proteínas auxiliares (adicionales a los polipéptidos que forman las RNA polimerasas) que se unen a sitios específicos en el DNA y alteran la transcripción de genes cercanos. (11.2, 12.4)

**Factores de transcripción generales (GTF)** Proteínas auxiliares necesarias para que la RNA polimerasa inicie la transcripción. Estos factores se denominan "generales" porque se requieren los mismos para la transcripción de una diversa colección de genes por la polimerasa. (11.5)

**Fagocitosis** Proceso por el cual los materiales fragmentados se aprisionan en las células. Los materiales se encierran dentro de un pliegue de la membrana plasmática, que brota en el citoplasma para formar una vesícula llamada fagosoma. (8.17)

**Familias** Agrupaciones de proteínas que han surgido de un único gen ancestral, que sufrió una serie de duplicaciones y modificaciones posteriores durante el curso de la evolución. (2.17)

**Fase M** parte del ciclo celular que incluye los procesos de mitosis —durante los cuales los cromosomas se dividen en dos núcleos— y la citocinesis, durante la cual toda la célula se divide físicamente en dos células hijas. (14.1)

**Fase S** La fase del ciclo celular en la que se produce la replicación. (14.1)

**Fermentación** Una vía metabólica anaeróbica en la que el piruvato se convierte en otra molécula (a menudo lactato o etanol, según el organismo) y la NAD+ se regenera para usar en la glicólisis. (3.10)

**Fibra muscular** Una célula muscular esquelética, conocida como fibra muscular debido a su estructura en forma de cable; multinucleada y altamente ordenada, compuesta por cientos de miofibrillas cilíndricas más delgadas. (9.12)

**Fijación de nitrógeno** El proceso a través del cual el gas nitrógeno se reduce químicamente y se convierte en un componente de compuestos orgánicos. (1.4)

**Fijador** Una solución química que mata las células al penetrar rápidamente la membrana celular e inmovilizar todo su material macromolecular, de manera tal que la estructura de la célula se mantiene lo más cerca posible a cuando estaba viva. (18.2)

**Filamentos delgados** Uno de los dos tipos distintos de filamentos que dan a los sarcómeros su aspecto característico. Los filamentos delgados consisten principalmente en actina, y están dispuestos en una matriz hexagonal alrededor de cada filamento grueso, con cada filamento delgado situado entre dos filamentos gruesos. (9.12)

**Filamentos gruesos** Uno de los dos tipos distintos de filamentos que dan a los sarcómeros su aspecto característico. Los filamentos gruesos consisten principalmente en miosina, y están rodeados por una matriz hexagonal de filamentos delgados. (9.12)

**Filamentos intermedios** (**IF**) Fibras citoesqueléticas fuertes y semejantes a cuerdas, de unos 10 nm de diámetro, que según el tipo de célula pueden estar compuestas por una variedad de subunidades de proteínas capaces de ensamblarse en tipos similares de filamentos. Se cree que los IF brindan estabilidad mecánica a las células y proporcionan funciones especializadas específicas de tejidos. (9.1)

**Filtración en gel** Técnica de purificación en la que la separación de proteínas (o ácidos nucleicos) se basa principalmente en la

masa molecular. El material de separación consiste en pequeñas perlas porosas que se empaquetan en una columna a través de la cual la solución de proteína pasa lentamente. (18.11)

**Flagella** Orgánulos móviles con forma de pelo que se proyectan desde la superficie de diversas células eucariotas. Esencialmente la misma estructura que en los cilios, pero presente en mucho menor número. (9.7)

**Flavoproteínas** Un tipo de portador de electrones en el que un polipéptido está unido a uno de dos grupos prostéticos relacionados, ya sea FAD o FMN. (5.4)

**Fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH)** Técnica en la que las sondas DNA (o RNA) se marcan con colorantes fluorescentes, se hibridan con el DNA de hebra simple que permanece dentro de su cromosoma, y se localizan con un microscopio de fluorescencia. (10.8)

**Focos de replicación** Localización de las horquillas activas de replicación en el núcleo celular. Hay alrededor de 50 a 250 focos, cada uno de los cuales contiene aproximadamente 40 horquillas de replicación que en forma simultánea incorporan nucleótidos en cadenas de DNA. (13.6)

**Fosfoglicéridos** El nombre dado a los fosfolípidos de membrana que se construyen en una columna vertebral de glicerol. (4.2)

**Fosfoinosítidos** Incluye varios derivados del fosfatidilinositol fosforilados (por ejemplo, $PIP_1$, $PIP_2$ y $PIP_3$) que sirven como segundos mensajeros en las vías de señalización. (15.6)

**Fosfolípidos** Lípidos que contienen fosfato y representan los constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas celulares. Los fosfolípidos incluyen tanto los fosfoglicéridos como la esfingomielina. (4.2)

**Fosforilación a nivel de sustrato** Síntesis directa de ATP a través de la transferencia de un grupo fosfato desde un sustrato al ADP. (3.10)

**Fosforilación oxidativa** Formación de ATP impulsada por la energía derivada de electrones de alta energía, eliminados durante la oxidación del sustrato en vías como el ciclo TCA, con la energía liberada para la formación del ATP mediante el paso de los electrones a través de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. (5.4)

**Fotoautótrofo** Un autótrofo que utiliza la energía radiante del sol para convertir el $CO_2$ en compuestos orgánicos. (6.1)

**Fotofosforilación cíclica** La formación de ATP en los cloroplastos que se lleva a cabo por PSI independiente de PSII. (6.8)

**Fotofosforilación no cíclica** La formación de ATP durante el proceso de fotosíntesis que libera oxígeno, en la que los electrones se mueven en una ruta lineal desde el $H_2O$ hasta la $NADP^+$. (6.8)

**Fotólisis** La división del agua durante la fotosíntesis. (6.6)

**Fotón** Paquete de energía luminosa. Cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor será la energía de los fotones. (6.4)

**Fotorrespiración** Una serie de reacciones en las que el $O_2$ se une al RuBP y eventualmente resulta en la liberación del recién fijado $CO_2$ desde la planta. (6.9)

**Fotosíntesis** La vía que convierte la energía de la luz solar en energía química que pueden utilizar los organismos vivos. (6.1)

**Fotosistema I (PSI)** Uno de los dos complejos de pigmentos, separados espacialmente, necesarios para aumentar la energía de un par de electrones lo suficiente como para eliminarlos de una molécula de agua y transferirlos a la $NADP^+$. El fotosistema I incrementa la energía de los electrones desde aproximadamente un nivel en el punto a medio camino hasta un nivel por encima de la $NADP^+$. (6.5)

**Fotosistema II (PSII)** Uno de los dos complejos de pigmentos, separados espacialmente, necesarios para aumentar la energía de un par de electrones lo suficiente como para eliminarlos de una molécula de agua y transferirlos a la $NADP^+$. El fotosistema II incrementa la energía de los electrones desde el nivel del agua, por debajo en el mínimo de energía, hasta aproximadamente el punto a medio camino. (6.5)





**Fracción altamente repetida** Secuencias de DNA usualmente cortas (unos pocos cientos de nucleótidos en su forma más larga) que están presentes en al menos $10^5$ copias por genoma. Es típico que las secuencias altamente repetidas representen alrededor del 10 por ciento del DNA de los vertebrados. (10.8)

**Fracción no repetida** Aquellas secuencias de DNA en el genoma presentes en solo una copia por conjunto haploide de cromosomas. Estas secuencias contienen la mayor cantidad de información genética, incluidos los códigos para prácticamente todas las proteínas que no sean las histonas. (10.8)

**Fraccionamiento subcelular** Un enfoque que permite separar unos de otros distintos orgánulos con propiedades diferentes (por ejemplo, núcleo, mitocondria, membrana plasmática, retículo endoplásmico). (8.2)

**Fracciones repetidas moderadamente** Secuencias de DNA que se repiten desde unas pocas hasta varios cientos de miles de veces dentro de un genoma eucariota. La fracción repetida moderadamente del DNA puede variar de un 20 al 80 por ciento del DNA total aproximadamente. Estas secuencias pueden ser idénticas o no idénticas entre sí, pero sí relacionadas. (10.8)

**Fragmentos de Okazaki** Pequeños segmentos de DNA que se unen rápidamente a piezas más largas, que se han sintetizado previamente, para formar la hebra retrasada. (13.2)

**Fragmoplasto** Material denso, más o menos alineado en el plano ecuatorial de la placa metafásica previa en las células vegetales, que consiste en grupos de microtúbulos interdigitantes orientados en forma perpendicular a la futura placa celular, junto con vesículas y material asociado denso en electrones. (14.11)

**Fuerza de Van der Waals** Una fuerza de atracción débil debido a las asimetrías transitorias de carga dentro de los átomos o moléculas adyacentes. (2.3)

**Fuerza protón-motriz ($\Delta p$)** Un gradiente electroquímico que se construye a través de membranas transductoras de energía (membrana mitocondrial interna, membrana tilacoide, membrana plasmática bacteriana) después de la translocación de protones durante el transporte de electrones. La energía del gradiente, que comprende tanto un gradiente de pH como de voltaje —y se mide en volt— se utiliza en la formación del ATP. (5.6)

**Fusión celular** Técnica mediante la cual dos tipos diferentes de células (de un organismo o de diferentes especies) se unen para producir una célula con una membrana plasmática continua. (4.7)

## G

**Gametofito** La etapa haploide del ciclo de vida de las plantas, que comienza con las esporas generadas durante la etapa de esporofito. Durante la etapa de gametofito los gametos se forman a través del proceso de mitosis. (14.12)

**γ-tubulina** Un tipo de tubulina que representa un componente crítico en la nucleación de microtúbulos. (9.5)

**Gas nervioso** Un arma química que envenena el sistema nervioso. (4.0)

**Gen regulador** Gen que codifica una proteína represora bacteriana. (12.1)

**Genes** En términos no moleculares, una unidad de herencia que gobierna el carácter de un rasgo particular. En términos moleculares, un segmento de DNA que contiene la información de un único polipéptido o molécula de RNA, incluidas las regiones transcritas pero no codificantes. (10.1)

**Genes divididos** Genes con secuencias intermedias. (11.6)

**Genes estructurales** Genes que codifican moléculas de proteína. (12.1)

**Genes supresores de tumores** Genes que codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y evitan que las células se vuelvan malignas. (16.5)

**Genoma** El complemento de información genética única para cada especie de organismos. Equivalente al DNA de un conjunto haploide de cromosomas de esa especie biológica. (10.1)

**GGA** Una proteína adaptadora que consta de varios dominios distintos. (8.11)

**Glicocálix** Una capa muy cercana aplicada a la superficie exterior de la membrana plasmática. Contiene carbohidratos de membrana junto con materiales extracelulares que han sido secretados por la célula hacia el espacio externo, donde permanecen estrechamente asociados con la superficie celular. (7.2)

**Glicosaminoglicanos (GAG)** Un grupo de polisacáridos altamente ácidos con la estructura —A — B — A — B—, donde A y B representan dos azúcares diferentes. (2.6)

**Glicosilación** Las reacciones por las cuales los grupos de azúcar se agregan a las proteínas y a los lípidos. (4.3)

**Glicosiltransferasas** Una gran familia de enzimas que transfieren azúcares específicos de un donante específico (un azúcar de nucleótido) a un receptor específico (típicamente el extremo en crecimiento de una cadena de oligosacáridos). (8.6)

**Glioxisoma** Orgánulo encontrado en células vegetales que sirve como sitio para las reacciones enzimáticas, incluida la conversión en carbohidratos de ácidos grasos almacenados. (5.10)

**Glucógeno** Polímero de glucosa altamente ramificado, que sirve como energía química fácilmente disponible en la mayoría de las células animales. (2.6)

**Glucolípidos** Moléculas lipídicas a base de esfingosina unidas a carbohidratos, a menudo componentes activos de las membranas plasmáticas. (4.2)

**Glucólisis** La primera vía en el catabolismo de la glucosa, no requiere oxígeno y da como resultado la formación de piruvato. (3.9)

**Gluconeogénesis** Proceso por el cual la glucosa se sintetiza a partir de piruvato. (3.13)

**Gradiente electroquímico** La diferencia conjunta en carga eléctrica y concentración de soluto que determina la capacidad de un electrólito para difundir entre dos compartimientos. (4.9)

**Grana** Arreglo ordenado y apilado de tilacoides. (6.2)

**Gránulo secretor** Estructura grande, densamente empaquetada, unida a la membrana, conteniendo materiales secretores altamente concentrados que se descargan en el espacio extracelular (son secretados) después de una señal estimulante. (8.1)

**Grasas** Moléculas que consisten en un esqueleto de glicerol unido por enlaces éster a tres ácidos grasos, también denominados triacilgliceroles. (2.7)

**Grupo cabeza** La región polar soluble en agua de un fosfolípido, que consiste en un grupo fosfato unido a una o varias moléculas pequeñas e hidrófilas. (4.2)

**Grupos de enlace** Grupos de genes que residen en el mismo cromosoma y causan una segregación no independiente de los rasgos controlados por estos genes. (10.3)

**Grupos funcionales** Grupos particulares de átomos que tienden a actuar como una unidad, y que a menudo afectan el comportamiento químico y físico de las moléculas orgánicas más grandes a las que pertenecen. (2.5)

**Guanosina trifosfato (GTP)** Un nucleótido de gran importancia en las actividades celulares. Se une a una variedad de proteínas (llamadas proteínas G) y actúa como un interruptor para activar sus actividades. (2.18)

## H

**Haploide** Que contiene solo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Las células haploides se producen durante la meiosis, como lo ejemplifican los espermatozoides. Contrasta con el diploide. (10.8)

**Haplotipo** Un bloque del genoma que tiende a heredarse intacto de generación en generación. Los haplotipos se definen generalmente por la presencia de una combinación consistente de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). (HP10.16)

**Hebra beta (β)** Una posible estructura secundaria de un polipéptido, en la que la columna vertebral de la cadena asume una conformación plegada (o plisada). (2.9)

**Hebra conductora** La hebra de DNA hija recién sintetizada que se sintetiza continuamente, llamada así porque su síntesis continúa a medida que la horquilla de replicación avanza. (13.2)

**Hebra rezagada** La hebra de DNA hija recién sintetizada que se sintetiza de forma discontinua, llamada así porque la iniciación de cada fragmento debe esperar a que las cadenas parentales se separen y expongan una plantilla adicional. (13.2)

**Helicasa** Una proteína que desenrolla el dúplex de DNA (o RNA) en una reacción en la que la energía liberada por la hidrólisis del ATP se utiliza para romper los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas. (13.3)

**Hélice alfa (α)** Una posible estructura secundaria de polipéptidos, en la que el esqueleto de la cadena forma un espiral (es decir, helicoidal). (2.9)

**Hemicelulosas** Polisacáridos ramificados de la pared celular de la planta, cuya columna vertebral consta de un azúcar como la glucosa, y cadenas laterales de otros azúcares como la xilosa. (7.14)

**Hemidesmosoma** Estructura adhesiva especializada en la superficie basal de las células epiteliales, que funciona para unir las células a la membrana basal subyacente. El hemidesmosoma contiene una placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática, con filamentos que contienen queratina que penetran en el citoplasma. (7.6)

**Hendidura sináptica** El gap estrecho entre dos células excitables. Una célula presináptica conduce los impulsos hacia la sinapsis; una célula postsináptica siempre se encuentra en el lado receptor de la sinapsis. (4.18)

**Herencia epigenética** Cambios hereditarios; es decir, cambios que se pueden transmitir de una célula a su progenie que no implican cambios en la secuencia del DNA. Los cambios epigenéticos pueden resultar de la metilación del DNA, la modificación covalente de las histonas, y probablemente otros tipos de modificaciones de la cromatina. (12.7)

**Heterocromatina** Cromatina que permanece compactada durante la interfase. (12.4)

**Heterocromatina constitutiva** Cromatina que permanece en estado compactado en todas las células en todo momento, y por tanto representa el DNA que se silencia de forma permanente. Se compone principalmente de secuencias altamente repetidas. (12.4)

**Heterocromatina facultativa** Cromatina que se ha inactivado específicamente durante ciertas fases de la vida de un organismo. (12.4)

**Heterótrofo** Organismo que depende de una fuente externa de compuestos orgánicos. (6.1)

**Hibridación de ácidos nucleicos** Un conjunto de diversas técnicas relacionadas que se basan en el hecho de que dos moléculas

de hebra simple de ácido nucleico, de secuencia de base complementaria, formarán un híbrido de hebra doble. (18.18)

**Hibridomas** Células híbridas producidas por la fusión de un linfocito productor de anticuerpos normal y una célula de mieloma maligno. Los hibridomas proliferan, produciendo grandes cantidades de un único anticuerpo (monoclonal) que la célula normal estaba sintetizando antes de la fusión con la célula de mieloma. (18.26)

**Hidrofílico** La tendencia de las moléculas polares a interactuar con las moléculas de agua circundantes, que también son polares; derivado de "amante del agua". (2.3)

**Hidrolasas ácidas** Enzimas hidrolíticas con actividad óptima en pH ácido. (8.15)

**Hilado** Método basado en computadora para pronosticar la estructura tridimensional de una proteína, al alinear una secuencia de aminoácidos con la estructura tridimensional de una proteína relacionada cuya estructura ya es conocida. (2.12)

**Histona acetiltransferasas (HAT)** Enzimas que transfieren grupos acetilo a los residuos de lisina y arginina de las histonas centrales. La acetilación de histonas se asocia con la activación de la transcripción. (12.15)

**Histonas** Una colección de proteínas básicas de la cromatina *s*, pequeñas y bien definidas. (12.3)

**Histonas desacetilasa** (**HDAC**) Enzimas que catalizan la eliminación de grupos acetilo de las histonas centrales. La desacetilación de histonas se asocia con la represión de la transcripción. (12.17)

**Homogeneizar** Desmenuzar mecánicamente las células. (8.2)

**Horquillas de replicación** Los puntos en los que el par de segmentos replicados de DNA se acercan uno al otro y se unen a los segmentos no replicados. Cada bifurcación de replicación corresponde a un sitio donde 1) la doble hélice parental está experimentando la separación de las hebras y 2) los nucleótidos se están incorporando en las recién sintetizadas hebras complementarias. (13.2)

**Hoyos recubiertos** Dominios especializados de la membrana plasmática; los hoyos recubiertos sirven como puntos de recolección para los receptores que se enlazan a sustancias que ingresan a una célula por medio de la endocitosis. (8.17)

**Huella de DNA** Un método para mapear los sitios de unión del factor de transcripción, mediante la prueba de si el factor unido protege las diferentes regiones de un gen de la digestión por enzimas que digieren el DNA. (12.13)

**Huso mitótico** La "máquina" contenedora de microtúbulos y que funciona en la organización y clasificación de los cromosomas duplicados durante la división celular mitótica. (14.7)

## I

**Impronta genética o Imprinting** Expresión de diferencia de los genes, dependiendo únicamente de si fueron contribuidos al cigoto por el esperma o el óvulo. (12.17)

**Impulso nervioso** Proceso mediante el cual se propaga un potencial de acción a lo largo de la membrana de una neurona, activando secuencialmente potenciales de acción en tramos adyacentes de membrana. (4.17)

***In vitro*** Fuera del cuerpo. Se dice que las células de cultivos se cultivan i*n vitro*; y los estudios sobre células cultivadas son una herramienta esencial de los biólogos celulares y moleculares. (1.2)

**Inductor** Un compuesto que se une a un represor de proteínas y activa la transcripción de un operón bacteriano. (12.1)

**Inestabilidad dinámica** Un término que se relaciona con las propiedades de ensamblaje/desensamblaje del extremo positivo de un microtúbulo. El término describe el hecho de que los microtúbulos en crecimiento y contracción pueden coexistir en la misma región de una célula, y que un microtúbulo dado puede alternar de forma impredecible entre las fases de crecimiento y acortamiento. (9.6)

**Inflamación** La acumulación localizada de líquido y leucocitos en respuesta a una lesión o infección que causa enrojecimiento, hinchazón y fiebre. (17.1)

**Inhibición de la retroalimentación** Un mecanismo para controlar las vías metabólicas en las que el producto final interactúa con una enzima en la vía, resultando en la inactivación de la enzima. (3.12)

**Inhibidor competitivo** Un inhibidor enzimático que compite con las moléculas de sustrato para acceder al sitio activo. (3.7)

**Inhibidor de enzimas** Cualquier molécula que se puede unir a una enzima y disminuir su actividad, clasificada como competitiva o no competitiva, según la naturaleza de la interacción con la enzima. (3.7)

**Inhibidor irreversible** Un inhibidor enzimático que se une fuertemente, a menudo de forma covalente, inactivando la molécula enzimática de forma permanente. (3.7)

**Inhibidor no competitivo** Un inhibidor enzimático que no se une en el mismo sitio que el sustrato, y así el nivel de inhibición sólo depende de la concentración del inhibidor. (3.7)

**Inicio de la replicación** El primer paso de la replicación del DNA, donde la DNA polimerasa se carga en el DNA y las hebras de DNA se separan para permitir que la polimerasa comience a copiar el DNA. (13.2)

**Inmunidad** Estado en el que el cuerpo no es susceptible a la infección por un patógeno en particular. (17.1)

**Inmunidad humoral** Inmunidad mediada por anticuerpos generados por la sangre. (17.1)

**Inmunidad mediada por células** Llevada a cabo por linfocitos T, que cuando se activan pueden reconocer y matar específicamente a una célula infectada (o extraña) (17.1)

**Inmunofluorescencia directa** Técnica para la localización intracelular de un antígeno, donde los anticuerpos se conjugan con pequeñas moléculas fluorescentes para formar derivados, que luego se incuban con las células o secciones de células. Entonces los sitios de unión se visualizan con el microscopio de fluorescencia. (18.26)

**Inmunofluorescencia indirecta** Una variación de la inmunofluorescencia directa, en la que las células se tratan con un anticuerpo no marcado que permite formar un complejo con el antígeno correspondiente. La ubicación de la pareja antígeno-anticuerpo se revela después en un segundo paso, utilizando una preparación de anticuerpos marcados con fluorescencia, cuyos sitios de combinación se dirigen contra las moléculas del anticuerpo utilizadas en el primer paso. (18.26)

**Integrinas** Una superfamilia de proteínas integrales de membrana que se unen específicamente a moléculas extracelulares. (7.5)

**Interacción hidrófoba** La tendencia de las moléculas no polares a agregarse para minimizar su interacción colectiva con las moléculas de agua polares circundantes; derivado de "temor al agua". (2.3)

**Interfase** La porción del ciclo celular entre los periodos de división celular. (14.1)

**Interferencia RNA** (**RNAi**) Un fenómeno natural en el que los RNA de doble hebra (dsRNA) conducen a la degradación de los mRNA que tienen secuencias idénticas. Se cree que el RNAi funciona principalmente para bloquear la replicación de virus y restringir el movimiento de elementos móviles, ambos involucrando la formación de intermediarios del dsRNA. Se puede lograr que

las células de mamífero se involucren en el RNAi mediante el tratamiento de las células con RNA pequeños (21 nucleótidos). Estos pequeños RNA (siRNA) inducen la degradación de los mRNA que contienen la misma secuencia. (11.10)

**Intermediario metabólico** Un compuesto que se produce durante un paso de una vía metabólica. (2.5, 3.9)

**Intrones** Aquellas partes de un gen dividido que corresponden a las secuencias intrónicas o interventoras. (11.6)

**Inversión** Una aberración cromosómica que se produce después de que un cromosoma se rompe en dos lugares y el segmento central resultante se reincorpora al cromosoma en orden inverso. (12.6)

**Ion** Un átomo o molécula con una carga neta positiva o negativa porque ha perdido o ganado uno o más electrones durante una reacción química. (2.1)

**Isoformas** Versiones diferentes de una proteína. Las isoformas pueden ser codificadas por genes separados relacionados estrechamente, o formadas como variantes de empalme mediante empalmes alternativos de un solo gen. (2.17)

**Isotónico o isosmótico** Propiedad de un compartimiento que tiene la misma concentración de soluto en comparación con la de otro compartimiento dado. (4.10)

## L

**Lamelipodio** El borde de ataque de un fibroblasto en movimiento que se extiende hacia afuera desde la célula como una proyección amplia, aplanada, similar a un velo que se desliza sobre el sustrato. (9.14)

**Lámina beta (β)** Una posible estructura secundaria de un polipéptido, en la que varias cadenas β se encuentran paralelas entre sí, creando la conformación de una lámina. (2.9)

**Lámina nuclear** Una malla fina compuesta por filamentos intermedios que recubren la superficie interna de la envoltura nuclear. (12.2)

**Lente objetivo** La lente de un microscopio óptico que enfoca los rayos de luz de la muestra para formar una imagen real y ampliada del objeto dentro de la columna del microscopio. (18.1)

**Ligando** Cualquier molécula que se puede enlazar a un receptor por tener una estructura complementaria. (4.1, 15.1)

**Límite de resolución** La resolución que se puede obtener con un microscopio está limitada por la longitud de onda de la iluminación según la ecuación

$$d = \frac{0.61\ \lambda}{n \text{ sen } \alpha}$$

donde $d$ es la distancia mínima a la que deben estar separados dos puntos en la muestra para resolverlos; λ es la longitud de onda de la luz, y $n$ el índice de refracción del medio. Alfa (α) es una medida de la capacidad de captación de luz de la lente, y está relacionada directamente con su abertura. Para un microscopio óptico el límite de resolución es ligeramente inferior a 200 nm. (18.1)

**Línea celular** Células usadas comúnmente en estudios de cultivo de tejidos que han sufrido modificaciones genéticas que les permiten crecer indefinidamente. (18.9)

**Linfocitos** Leucocitos nucleados (glóbulos blancos), que circulan entre la sangre y los órganos linfáticos, y que median la inmunidad adquirida. Incluye tanto las células B como las células T. (17.1)

**Linfocitos B** (o **células B**) Linfocitos que responden al antígeno al proliferar y diferenciarse en células plasmáticas que secretan anticuerpos nacidos en la sangre. Estas células alcanzan su estado diferenciado en la médula ósea. (17.1)

**Linfocitos T** (o **células T**) Linfocitos que responden al antígeno al proliferar y diferenciarse en CTL (linfocitos citotóxicos) que atacan y matan las células infectadas, o las células Th que son necesarias para la producción de anticuerpos por parte de las células B. Estas células alcanzan su estado diferenciado en el timo. (17.1)

**Liposoma** Una bicapa lipídica artificial que se autoensambla en una o más vesículas esféricas cuando se encuentra en un ambiente acuoso. (4.2)

***Locus*** (**pl. *Loci***) La posición de un gen en un cromosoma. (10.4)

**Lupus eritematoso sistémico** (**LES**) Trastorno autoinmune en el que se producen anticuerpos contra varios antígenos nucleares, lo que ocasiona daños en diversos tejidos del cuerpo. (17.3)

## M

**Macromoléculas** Moléculas grandes y altamente organizadas, cruciales para la estructura y función de las células; se dividen en polisacáridos, ciertos lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (2.5)

**Mapeo de deleción** Un método para identificar regiones importantes para la regulación transcripcional, probando la expresión de construcciones artificiales de DNA en las que faltan partes de la secuencia de DNA. (12.13)

**Marco de lectura** Una división de una secuencia de RNA en grupos de tres nucleótidos que constituyen codones. (11.16)

**Material pericentriolar (PCM)** Material amorfo y denso de electrones que rodea los centriolos de una célula animal. (9.5)

**Matriz** Uno de los dos compartimientos acuosos de una mitocondria; la matriz se encuentra dentro del interior del orgánulo; el segundo compartimiento se denomina espacio **intermembrana**, y está ubicado entre la membrana mitocondrial externa y la interna. (5.1)

**Matriz extracelular (MCE)** Una red organizada de materiales extracelulares que está presente más allá de la vecindad inmediata de la membrana plasmática. Puede desempeñar un papel integral en determinar la forma y las actividades de la célula. (7.2)

**Mecanismo quimiosmótico** El mecanismo para la síntesis de ATP, mediante el cual el movimiento de electrones a través de la cadena de transporte de electrones da como resultado el establecimiento de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial bacteriana, tilacoide o interna, con el gradiente actuando como un intermediario de alta energía, vinculando la oxidación de sustratos a la fosforilación del ADP. (5.2)

**Meiosis** El proceso durante el cual se reduce el número de cromosomas para que se formen células que contienen un solo miembro de cada par de cromosomas homólogos. (14.12)

**Membrana basal** (**lámina basal**) Capa engrosada de aproximadamente 50 a 200 nm de matriz extracelular que rodea las células musculares y grasas, y subyace en la superficie basal de los tejidos epiteliales como la piel, el revestimiento interno de las vías digestivas y respiratorias, y el revestimiento interno de los vasos sanguíneos. (7.2)

**Membrana plasmática** Membrana que sirve como un límite entre el interior de una célula y su entorno extracelular. (4.1)

**Metabolismo** El total de las reacciones químicas que ocurren dentro de una célula. (1.2, 3.9)

**Metafase** La etapa de la mitosis en el cual todos los cromosomas se han alineado en el ecuador del huso, con una cromátida de cada cromosoma conectada a un polo y su cromátida hermana conectada al polo opuesto. (14.9)

**Metaloproteinasas de la matriz** (**MMP**) Una familia de enzimas que contienen zinc, y que actúan en el espacio extracelular para digerir varias proteínas y proteoglicanos extracelulares. (7.4)

**Metástasis** La diseminación de células cancerosas desde un tumor primario a sitios distantes en el cuerpo, donde puede surgir la formación de tumores secundarios. (7.8)

**Mezcla de exones** El movimiento de "módulos" genéticos entre genes no relacionados facilitados por la presencia de intrones; los intrones actúan como elementos espaciadores inertes entre los exones. (11.8)

**Microarreglos de DNA** "Chips de DNA" preparados al detectar el DNA de diferentes genes en una ubicación conocida y ordenada en un portaobjetos de vidrio. El portaobjetos luego se incuba con cDNA marcados con fluorescencia, cuyo nivel de hibridación proporciona una medida del nivel de expresión de cada gen en la matriz. (12.10)

**Microfibrillas** Paquetes de moléculas de celulosa que confieren rigidez a la pared celular y resistencia a las fuerzas de tracción. (7.14)

**Microfilamentos** Estructuras citoesqueléticas sólidas, de 8 nm de grosor, compuestas de un polímero de doble hélice de la proteína actina. Desempeñan un papel clave en prácticamente todos los tipos de contractilidad y motilidad dentro de las células. (9.9)

**Micrómetro** Medida de longitud igual a $10^{-6}$ metros. (1.7)

**MicroRNA (miRNA)** RNA pequeños (20-23 nucleótidos de longitud) que se sintetizan a partir de muchos sitios en el genoma, y están involucrados en inhibir la traducción o incrementar la degradación de los mRNA complementarios. (11.12)

**Microscopio** Un instrumento que proporciona una imagen ampliada de un objeto pequeño. (1.1)

**Microscopio confocal de barrido** Un microscopio en el que la muestra está iluminada por un rayo láser finamente enfocado, que escanea toda la muestra rápidamente a una sola profundidad, por lo que solo ilumina un plano delgado (o "sección óptica") dentro del objeto. El microscopio se emplea usualmente con muestras teñidas fluorescentes, y la luz emitida desde la sección óptica iluminada se usa para formar una imagen de esa sección en una pantalla de video. (18.3)

**Microscopio de campo claro** Un microscopio en el cual el condensador de la subetapa hace que la luz de la fuente converja en la muestra, formando así un cono de luz brillante que puede entrar en la lente objetivo. (18.2)

**Microscopio de contraste de fase** Un microscopio que convierte las diferencias en el índice de refracción en diferencias de intensidad (brillo relativo y oscuridad) visibles para el ojo, lo que hace que los objetos altamente transparentes sean más visibles. (18.2)

**Microscopio de fuerza atómica (AFM)** Un instrumento de escaneo de alta resolución que se está volviendo cada vez más importante en la nanotecnología y biología molecular. El AFM funciona al desplazar una sonda delicada sobre la superficie de la muestra. (18.7)

**Microsomas** Una colección heterogénea de vesículas formadas a partir del sistema endomembrana (principalmente en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi) después de la homogeneización. (8.2)

**Microtúbulos** Estructuras citoesqueléticas huecas y cilíndricas, de 25 nm de diámetro, cuya pared está compuesta por la proteína tubulina. Los microtúbulos son polímeros ensamblados a partir de heterodímeros de αβ-tubulina, que están dispuestos en filas o protofilamentos. Debido a su rigidez, los microtúbulos a menudo actúan en capacidad de soporte. (9.1)

**Miofibrillas** Las hebras finas y cilíndricas que se encuentran dentro de las fibras musculares. Cada miofibrilla está compuesta por matrices lineales repetitivas de unidades contráctiles llamadas **sarcómeros**, que dan a las células del músculo esquelético su apariencia estriada. (9.12)

**Miosinas convencionales (o tipo II)** Una familia de miosinas, identificada por primera vez en el tejido muscular, que son los motores primarios para la contracción muscular, pero también se encuentran en una variedad de células que no son músculos. Las miosinas tipo II son necesarias para dividir una célula en dos durante la división celular, generar tensión en las adherencias focales, y en el comportamiento de giro de los conos de crecimiento. (9.11)

**Miosinas no convencionales** (véase Miosina) (9.11)

**Mitocondria** El orgánulo celular donde tiene lugar la transducción de energía aeróbica, oxidando intermedios metabólicos como el piruvato para producir ATP. (5.1)

**Mitosis** Proceso de división nuclear en el que los cromosomas duplicados se separan fielmente entre sí produciendo dos núcleos, cada uno con una copia completa de todos los cromosomas presentes en la célula original. (14.1)

**Modelos animales** Animales de laboratorio que muestran características de una enfermedad humana particular. (18.24)

**Modificaciones postraduccionales (PTM)** Alteraciones en las cadenas laterales de los 20 aminoácidos básicos después de su incorporación en una cadena polipeptídica. (2.8)

**Modulación alostérica** Modificación de la actividad de una enzima a través de la interacción con un compuesto que se enlaza a un sitio (es decir, a un sitio alostérico) distinto del sitio activo. (3.12)

**Moléculas mensajeras extracelulares** El medio por el cual las células por lo general se comunican entre sí. Los mensajeros extracelulares pueden viajar una distancia corta y estimular las células que están cerca del origen del mensaje, o pueden viajar por todo el cuerpo estimulando potencialmente las células que están muy lejos de la fuente. (15.1)

**Moléculas no polares** Moléculas cuyos enlaces covalentes tienen una distribución de carga casi simétrica, porque los átomos componentes tienen aproximadamente la misma electronegatividad. (2.1)

**Moléculas polares** Moléculas con una distribución desigual de carga porque los átomos componentes de varios enlaces tienen electronegatividades muy diferentes. (2.1)

**Montaje completo** Un espécimen que debe observarse al microscopio como un objeto intacto, ya sea vivo o muerto, y puede ser un organismo entero intacto o una pequeña parte de un organismo mayor. (18.2)

**Mundo RNA** Una etapa propuesta en la evolución temprana de la vida, antes de la aparición de DNA y proteínas, en las que las moléculas de RNA sirvieron como ambos: como material genético y como catalizadores. (11.0)

**Mutación** Un cambio espontáneo en un gen, que lo altera de manera permanente para causar un cambio hereditario. (10.4)

**Mutaciones de desplazamiento de marco** Mutaciones en las que un solo par de bases se agrega o se elimina del DNA, lo que resulta en un marco de lectura incorrecto desde el punto de la mutación hasta el resto de la secuencia de codificación. (11.17)

**Mutaciones sensibles a la temperatura (ts)** Mutaciones que solo se expresan fenotípicamente cuando las células (u organismo) crecen a mayor temperatura (restrictiva). A la temperatura menor (permisiva) la proteína codificada es capaz de mantenerse bien unida, lo suficiente como para llevar a cabo su actividad, lo que lleva a un fenotipo relativamente normal. Las mutaciones ts son particularmente útiles para estudiar actividades requeridas como la secreción y la replicación, porque las mutaciones "ordinarias" que afectan estos procesos suelen ser letales. (13.2)

**Mutaciones sin sentido** Mutaciones que producen codones de parada dentro de los genes, lo que provoca la terminación prematura de la cadena polipeptídica codificada. (11.18)

 **Mutagénesis dirigida al sitio** Una técnica de investigación para modificar un gen de manera predeterminada a fin de producir una proteína con una secuencia de aminoácidos alterada específicamente. (2.16, 18.25)



**Mutante** Un individuo que tiene una característica heredable que lo distingue del tipo natural o primitivo. (10.4)

## N

**Nanómetro** Medida de longitud igual a $10^{-9}$ metros. (1.7)

**Nativa** La estructura tridimensional natural de una proteína u otra macromolécula cuando está dentro de una célula viva. (2.12)

**Neurofilamentos** Paquetes empacados débilmente de filamentos intermediarios ubicados dentro del citoplasma de las neuronas. Los neurofilamentos tienen ejes largos orientados en paralelo al axón de las células nerviosas, y están compuestos por tres proteínas distintas: NF-L, NF-H y NF-M. (9.9)

**Neurotransmisor** Una sustancia química que se libera de una terminal presináptica y se une a la célula objetivo postsináptica, lo que altera el potencial de membrana de la célula objetivo. (4.18)

**Núcleo** El orgánulo que contiene el material genético de una célula eucariota. (1.3)

**Nucleoide** La región mal definida de una célula procariota que contiene su material genético. (1.3)

**Nucléolos** Estructuras nucleares de forma irregular que funcionan como orgánulos productores de ribosomas. (11.4)

**Nucleosomas** Subunidades repetidas de la cromatina. Cada nucleosoma contiene una partícula de núcleo de nucleosoma que consta de 146 pares de bases de DNA súper enrollado, envueltas casi dos veces alrededor de un complejo en forma de disco de ocho moléculas de histona. Las partículas del núcleo del nucleosoma están conectadas entre sí por una tira de DNA enlazante. (12.3)

**Nucleótido** Un monómero o bloque de construcción de DNA o RNA, que consiste en una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. (2.18, 10.5)

**Número de sustitución** El número máximo de moléculas de sustrato que se pueden convertir en producto por una molécula de enzima en la unidad de tiempo. (3.7)

## O

**Oligosacáridos** Pequeñas cadenas compuestas de azúcares de forma covalente unidos a lípidos y proteínas; distinguen un tipo de célula de otra y ayudan a mediar las interacciones de una célula con su entorno. (2.6, 4.3)

**Oncogenes** Genes que codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de la célula a un estado maligno. Estos genes tienen la capacidad de transformar células. (16.5)

**Operador** Sitio de unión para los represores bacterianos que se encuentra entre el sitio de unión de la polimerasa y el primer gen estructural. (12.1)

**Operón** Un complejo funcional en un cromosoma bacteriano que comprende un grupo de genes que incluye genes estructurales, una región promotora, una región operadora y un gen regulador. (12.1)

**Operón inducible** Un operón en el que la presencia de la sustancia metabólica clave induce la transcripción de los genes estructurales. (12.1)

**Organismos modelo** Organismos que se han utilizado ampliamente para la investigación, por lo que se sabe mucho sobre su biología. Estos organismos tienen propiedades que los han convertido en excelentes sujetos de investigación. Tales organismos incluyen la bacteria *E. coli*; los brotes de levadura *S. cerevisiae*; el nematodo *C. elegans*; la mosca de la fruta *D. melanogaster*; la planta de mostaza *A. thaliana*; y el ratón *M. musculus*. (1.5)

**Orgánulos** Las estructuras intracelulares organizadas y funcionalmente diversas, membranosas o limitadas por membranas, que son la característica definitoria de las células eucariotas. (1.3)

**Origen de la replicación** El sitio específico del cromosoma bacteriano donde comienza la replicación. (13.2)

**Ósmosis** La propiedad del agua de pasar a través de una membrana semipermeable desde una región de menor concentración de soluto a una de mayor concentración de soluto, con la tendencia de igualar finalmente la concentración de soluto en los dos compartimientos. (4.10)

## P

**P680** El centro de reacción del fotosistema II; "P" significa pigmento y "680" es la longitud de onda de la luz que esta molécula absorbe con mayor fuerza. (6.5)

**P700** El centro de reacción del fotosistema I; "P" significa pigmento, y "700" es la longitud de onda de la luz que esta molécula absorbe con mayor fuerza. (6.5)

**Pared celular** Una estructura rígida y no viva que proporciona soporte y protección para la célula a la que rodea. (7.14)

**Paredes primarias** Las paredes de una célula vegetal en crecimiento. Permiten la extensibilidad. (7.14)

**Paredes secundarias** Paredes celulares más gruesas que se encuentran en la mayoría de las células vegetales maduras. (7.14)

**Partícula de reconocimiento de señal** (**SRP**) Una partícula que consta de seis polipéptidos distintos y una pequeña molécula de RNA, llamada RNA 7S, que reconoce la secuencia de señal a medida que emerge del ribosoma. La SRP se une a la secuencia de señal y luego a una membrana del retículo endoplásmico. (8.4)

**Pectinas** Una clase heterogénea de polisacáridos cargados negativamente que forman la matriz de la pared celular de la planta. Las pectinas retienen el agua y forman un gel que llena los espacios entre los elementos fibrosos. (7.14)

**Peptidasa de señal** Enzima proteolítica que elimina la porción N-terminal, incluido el péptido señal de un polipéptido naciente sintetizado en el RER. (8.4)

**Peptidil transferasa** La porción de la gran subunidad ribosomal que es responsable de catalizar la formación de enlaces peptídicos; la actividad de la peptidil transferasa reside en la gran molécula de RNA ribosomal. (11.17)

**Pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares** (**sno o RNP**) Partículas que se forman cuando los snoRNA se empaquetan con proteínas particulares; los snoRNP desempeñan un papel en la maduración y ensamblaje de los RNA ribosómicos. (11.4)

**Pequeños RNA de interferencia** (**siRNA**) Pequeños fragmentos de doble hebra (21-23 nucleótidos) formados cuando el RNA de doble hebra inicia la respuesta durante el silenciamiento del RNA. (11.10)

**Pequeños RNA nucleares** (**snRNA**) Pequeños RNA necesarios para el procesamiento del mRNA (90 a 300 nucleótidos de longitud) y que funcionan en el núcleo. (11.7)

**Pequeños RNA nucleolares (snoRNA)** Los RNA necesarios para la metilación y la pseudouridilación de los pre-rRNA durante la formación de ribosomas en el nucléolo. (11.4)

**Peroxisomas** Orgánulos simples, multifuncionales, unidos a la membrana del citoplasma, que llevan a cabo una gran variedad de reacciones metabólicas, incluida la oxidación de sustratos que

conduce a la formación de peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, los peroxisomas son el sitio de oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga, la oxidación del ácido úrico y la síntesis de plasmalógenos. Los glioxisomas de las plantas, que llevan a cabo el ciclo del glioxilato, son un tipo de peroxisoma. (5.10)

**pH** La medida estándar de acidez relativa, matemáticamente es igual a $-\log [H^+]$. (2.4)

**Pigmentos** Moléculas que contienen un cromóforo, grupo químico capaz de absorber luz de longitud(es) de onda particular(es) dentro del espectro visible. (6.4)

**Pinza beta (β)** Uno de los componentes no catalíticos del replisoma que rodea el DNA y mantiene la polimerasa asociada con la plantilla de DNA. (13.4)

**Pirimidina** Una clase de base nitrogenada que se encuentra en los nucleótidos; posee una estructura de un solo anillo que incluye **citosin**a y **timina**, que se encuentran en el DNA, y citosina y uracilo, que se encuentran en el RNA. (2.18, 10.5)

**Piwi-interactuantes (piRNA)** Pequeños RNA (24-32 bases) codificados por un pequeño número de *loci* genómicos grandes, que actúan para suprimir el movimiento de elementos transponibles en las células germinales. Los piRNA se derivan de precursores de una sola hebra, y no requieren Dicer para su procesamiento. (11.12)

**Placa celular** Estructura entre el citoplasma de dos células hijas recién formadas que da lugar a una nueva pared celular en células vegetales. (7.14, 14.11)

**Plantas $C_3$** Plantas que sólo dependen de la vía $C_3$ para fijar el $CO_2$ atmosférico (6.9)

**Plantas $C_4$** Plantas, principalmente pastos tropicales, que utilizan la vía de fijación de carbono $C_4$. (6.10)

**Plantas CAM** Plantas que utilizan la PEP carboxilasa para fijar el $CO_2$ al igual que las plantas $C_4$, pero conducen las reacciones dependientes de la luz y la fijación del carbono en diferentes momentos del día, para que los estomas se puedan cerrar durante las horas pico de pérdida de agua. (6.10)

**Plantilla** Una sola cadena de DNA (o RNA) que contiene la información (codificada como una secuencia de nucleótidos) para la construcción de una cadena complementaria. (13.2)

**Plasmodesmos** Canales citoplásmicos de diámetro 30 nm, que conectan la mayoría de las células vegetales y se extienden entre las células adyacentes directamente a través de la pared celular. Los plasmodesmos están recubiertos con una membrana plasmática y generalmente contienen una estructura central densa, el desmotúbulo, derivado del retículo endoplásmico de las dos células. (7.12)

**Plasmólisis** La contracción que se produce cuando una célula vegetal se coloca en un medio hipertónico; su volumen se reduce a medida que la membrana plasmática se aleja de la superficie que rodea la pared celular. (4.10)

**Poder reductor** El potencial de una célula para reducir los productos intermediarios metabólicos en productos, es usual que se mida mediante el tamaño del depósito NADPH. (3.11)

**Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)** Sitios en el genoma donde se encuentran bases alternativas con alta frecuencia en la población. Los SNP son excelentes marcadores genéticos para los estudios de mapeo del genoma. (10.15)

**Polimorfismos genéticos** Sitios en el genoma que varían con una frecuencia relativamente alta entre diferentes individuos en una población de una especie biológica. (10.15)

**Poliploidización (duplicación de todo el genoma)** Fenómeno en el que la descendencia tiene el doble de cromosomas en cada célula que sus padres diploides. Puede ser un paso importante en la evolución de una nueva especie. (10.10)

**Polirribosoma** (**polisoma**) El complejo formado por un mRNA y una serie de ribosomas en el proceso de traducción de ese mRNA. (11.19)

**Polisacárido** Un polímero de unidades de azúcar unidas por enlaces glicosídicos. (2.6)

**Potenciador** Un sitio regulador en el DNA que se puede ubicar a una distancia considerable corriente arriba o corriente abajo del promotor que regula. La unión de uno o más factores transcripcionales al potenciador puede aumentar en forma espectacular la velocidad de transcripción del gen. (12.15)

**Potencial de acción** Los cambios colectivos en el potencial de membrana, que comienzan con la despolarización hasta el umbral, y terminan con el retorno al potencial de reposo; se producen con la estimulación de una célula excitable y actúan como la base para la comunicación neuronal. (4.16)

**Potencial de membrana** La diferencia de potencial eléctrico a través de una membrana. (4.16)

**Potencial de oxidación-reducción (redox)** La separación de carga, medida en voltaje, para cualquier par de agentes reductores de oxidación como $NAD^+$ y NADH en relación con un par estándar (por ejemplo, $H^+$ y $H^2$). (5.4)

**Potencial de reposo** La diferencia de potencial eléctrico medida para una célula excitable cuando no está sujeta a estimulación externa. (4.16)

**Potencial de transferencia** Una medida de la capacidad de una molécula para transferir cualquier grupo a otra molécula, con las moléculas que tienen una mayor afinidad por el grupo siendo los mejoras aceptoras, y las moléculas que tienen una afinidad más baja las mejores donantes. (3.10)

**Potencial de transferencia de electrones** La afinidad relativa por los electrones, de manera tal que un compuesto con una baja afinidad tiene un alto potencial para transferir uno o más electrones en una reacción redox (y por tanto actúa como un agente reductor). (5.4)

**Pre-RNA** Una molécula de RNA que aún no se ha procesado a su forma madura final (por ejemplo, un pre-mRNA, pre-rRNA o pre-tRNA). (11.3)

**Primasa** Tipo de RNA polimerasa que ensambla los cebadores (iniciadores, primers) de RNA cortos que comienzan la síntesis de cada fragmento Okazaki de la cadena rezagada. (13.2)

**Primera ley de la termodinámica** La energía no se puede crear ni destruir. También conocida como principio de conservación de la energía. (3.1)

**Procesivo** Un término aplicado a las proteínas (por ejemplo, cinesina o RNA polimerasa) que son capaces de moverse distancias considerables a lo largo de su vía o plantilla (por ejemplo, un microtúbulo o una molécula de DNA) sin separarse de ella. (9.3)

**Profase** La primera etapa de la mitosis durante la cual los cromosomas duplicados se preparan para la segregación y se ensambla la maquinaria mitótica. (14.7)

**Prometafase** La fase de mitosis durante la cual se forma el huso mitótico definitivo y los cromosomas se colocan en posición en el centro de la célula. (14.8)

**Promotor** El sitio en el DNA al que se une una molécula de RNA polimerasa antes de iniciar la transcripción. El promotor contiene información que determina cuál de las dos cadenas de DNA se transcribe, y el sitio en el que comienza la transcripción. (11.2, 12.1)

**Propiedad hipertónica (o hiperosmótica)** de un compartimiento que tiene una mayor concentración de soluto en comparación con la de un compartimiento dado. (4.10)

**Propiedad hipotónica (o hipoosmótica)** de un compartimiento que tiene una concentración de soluto más baja en comparación con la de un compartimiento dado. (4.10)

**Proplastidios** precursores no pigmentados de los cloroplastos. (6.2)

**Proteasoma** Complejo multiproteico en forma de barril donde las proteínas citoplasmáticas se degradan. Las proteínas seleccionadas para la destrucción están ligadas a moléculas de ubiquitina, y se hilan en la cámara central del proteasoma. (12.21)

**Proteína anclada en lípidos** Una proteína asociada a la membrana que se encuentra fuera de la bicapa, pero está unida de forma covalente a una molécula de lípido dentro de la bicapa. (4.4)

**Proteína cinasa** Una enzima que transfiere grupos fosfato a otras proteínas, y a menudo tiene el efecto de regular la actividad de las otras proteínas. (3.12)

**Proteína fibrosa** Una proteína con una estructura terciaria muy alargada, se asemeja a una fibra. (2.10)

**Proteína globular** Una proteína con una estructura terciaria que es compacta, similar a un globo. (2.10)

**Proteína integral** Una proteína asociada a la membrana que penetra o atraviesa la bicapa lipídica. (4.4)

**Proteína reguladora de genes** Una proteína que es capaz de reconocer una secuencia específica de pares de bases dentro del DNA y unirse a esa secuencia con alta afinidad, lo que altera la expresión génica. (12.1)

**Proteína transmembrana** Una proteína que se inserta en una membrana y se extiende por todo el ancho de la membrana. (4.4)

**Proteínas** Grupos de polímeros estructural y funcionalmente diversos, construidos a partir de monómeros de aminoácidos. (7.14)

**Proteínas actina-enlazantes** Cualquiera de las casi 100 proteínas diferentes pertenecientes a numerosas familias que afectan el ensamblaje de los filamentos de actina, sus propiedades físicas y sus interacciones entre sí y con otros orgánulos celulares. (9.13)

**Proteínas ancladas a GPI** Proteínas de membrana periférica, que se anclan a la membrana a través de un enlace a una molécula de glicosilfosfatidilinositol de la bicapa. (4.4)

**Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP)** Proteínas distintas de la tubulina contenida en los microtúbulos obtenidos de las células. Las MAP pueden interconectar los microtúbulos para formar haces, y se pueden ver como puentes cruzados que conectan los microtúbulos entre sí. Otras MAP pueden aumentar la estabilidad de los microtúbulos, alterar su rigidez, o influir en su velocidad de ensamblaje. (9.2)

**Proteínas calcio-enlazantes** Proteínas, tal como la calmodulina, que enlazan el calcio y permiten que el calcio provoque una variedad de respuestas celulares. (15.14)

**Proteínas de hierro y azufre** Un grupo de portadores de electrones de proteínas con un centro inorgánico de hierro-azufre. (5.4)

**Proteínas de transferencia de lípidos** Facilitan el movimiento de lípidos específicos desde el retículo endoplásmico a otros orgánulos, sin la participación de vesículas de transporte. (8.5)

**Proteínas de unión a DNA de hebra simple (o SSB)** Proteínas que facilitan la separación de las cadenas de DNA mediante su unión a cadenas de DNA simples y desnudas, manteniéndolas en un estado extendido e impidiendo que se vuelvan a enrollar. (13.3)

**Proteínas de unión a GTP (o proteínas G)** Proteínas con funciones reguladoras clave en muchos procesos celulares diferentes, las proteínas G pueden estar presentes en al menos dos conformaciones alternativas, una forma activa que contiene una molécula de GTP unida y una forma inactiva que contiene una molécula de PIB unida. (8.4, 15.2)

**Proteínas MHC** Proteínas codificadas por la región MHC del genoma que enlaza antígenos procesados (péptidos antigénicos) y los expone en la superficie de la célula. Se dividen en dos clases principales, moléculas **MHC de clase I** producidas por prácticamente todas las células del cuerpo, y moléculas MHC de clase II producidas por APC "profesionales" como macrófagos y células dendríticas. (17.10)

**Proteínas motoras** Proteínas que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para generar fuerzas mecánicas que impulsan la proteína, así como la carga unida a ella, a lo largo de uno de los componentes del citoesqueleto. Se conocen tres familias de proteínas motoras: las cinesinas y las dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos, y las miosinas se mueven a lo largo de los microfilamentos. (9.2)

**Proteínas periféricas** Una proteína asociada a la membrana que se encuentra totalmente fuera de la bicapa lipídica, y que interactúa con ella a través de enlaces no covalentes. (4.4)

**Proteínas tirosina cinasas** Enzimas que fosforilan residuos de tirosina específicos de otras proteínas. (15.10)

**Proteoglicano** Un complejo proteína-polisacárido que consiste en una molécula de proteína central a la que se unen cadenas de glicosaminoglicanos. Debido a la naturaleza ácida de los glicosaminoglicanos, los proteoglicanos son capaces de unirse a un gran número de cationes, que a su vez atraen a un gran número de moléculas de agua. Como resultado los proteoglicanos forman un gel poroso e hidratado que actúa como un material de "relleno" para resistir la compresión. (7.3)

**Proteoma** El inventario completo de proteínas en un organismo, tipo de célula u orgánulo en particular. (2.15)

**Proteómica** Campo de expansión de la bioquímica de proteínas, que realiza estudios a gran escala en diversas mezclas de proteínas. (2.15)

**Protofilamentos** Filas ordenadas longitudinalmente de subunidades globulares de un microtúbulo, alineadas paralelas al eje largo del túbulo. (9.2)

**Protooncogén** Una variedad de genes que tienen el potencial de subvertir las actividades de la célula y empujar la célula hacia el estado maligno. Los protooncogenes codifican proteínas que tienen varias funciones en las actividades normales de una célula. Los protooncogenes se pueden convertir en oncogenes. (16.5)

**Protoplasto** Una célula vegetal desnuda, cuya pared celular ha sido digerida por la enzima celulasa. (18.9)

**Provirus** El término para el DNA viral cuando se ha integrado en el DNA del (de los) cromosoma(s) de su célula huésped. (1.8)

**Prueba o análisis** Alguna característica identificable de una proteína específica, como la actividad catalítica de una enzima, utilizada para determinar la cantidad relativa de esa proteína en una muestra. (18.11)

**Pseudogenes** Secuencias que son claramente homólogas a los genes funcionales, pero que tienen mutaciones acumuladas que las hacen no funcionales. (10.10)

**Puente disulfuro** Se forma entre dos cisteínas que están distantes entre sí en el esqueleto del polipéptido, o en dos polipéptidos separados. Ayudan a estabilizar las intrincadas formas de las proteínas. (2.8)

**Punto de control** Mecanismos que detienen el progreso del ciclo celular si 1) cualquiera de los DNA cromosómicos está dañado, o 2) ciertos procesos críticos, como la replicación del DNA, o la alineación de los cromosomas durante la mitosis, no se han completado correctamente. (14.5)

**Punto de control del conjunto del huso** (**SAC**) Un punto de control que opera en la transición entre la metafase y la anafase; el punto de control del huso se revela mejor cuando un cromosoma no se alinea correctamente en la placa metafásica. (14.10)

**Punto isoeléctrico** El pH al cual las cargas negativas de los aminoácidos componentes de una proteína son iguales a sus cargas positivas, por lo que la proteína es neutra. (18.11)

**Purina** Una clase de base nitrogenada que se encuentra en los nucleótidos; posee una estructura de doble anillo que incluye **adenina** y **guanina** que se encuentran tanto en el DNA como en el RNA. (2.18, 10.5)

## Q

**Quemoautótrofo** Un autótrofo que utiliza la energía almacenada en moléculas inorgánicas (como amoniaco, sulfuro de hidrógeno o nitritos) para convertir el $CO_2$ en compuestos orgánicos. (6.1)

**Quiasmas** Puntos específicos de unión entre los cromosomas homólogos de los bivalentes, observados a medida que los cromosomas homólogos se separan al comienzo de la etapa de diploteno de la profase 1 meiótica. Los quiasmas se encuentran en los sitios de los cromosomas en los que previamente se produjo un intercambio genético (intercambio de segmentos de cromosoma o *crossing over*). (14.13)

## R

**Rabs** Una familia de proteínas G monoméricas involucradas en el tráfico de vesículas. (8.13)

**Radical libre** Átomo o molécula altamente reactiva que contiene un solo electrón no pareado. (HP 2.2)

**Ran** Una proteína GTP-enlazante que existe en una forma activa GTP-enlazada o una forma inactiva GDP-enlazada. La Ran regula el transporte nucleocitoplásmico. (12.2)

**Rastreo de partícula única (SPT)** Una técnica para estudiar el movimiento de proteínas de membrana que consta de dos pasos: 1) vincular las moléculas de proteína a sustancias visibles como partículas de oro coloidal y 2) monitorear los movimientos de las partículas marcadas individuales bajo el microscopio. (4.7)

**Ratones knockout** Los ratones nacidos como resultado de una serie de procedimientos experimentales que carecen de un gen funcional que normalmente tendrían. (18.25)

**rDNA** Las secuencias de DNA que codifican el rRNA, que normalmente se repiten cientos de veces y usualmente se agrupan en una o unas pocas regiones del genoma. (11.4)

**Reacción de oxidación-reducción (redox)** Una reacción en la que se produce un cambio en el estado electrónico de los reaccionantes. (3.9)

**Reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR)** Una técnica en la que una sola región de DNA, que puede estar presente en cantidades extremadamente pequeñas, se puede amplificar de forma rápida y barata. (18.21)

**Reacciones dependientes de la luz** Primera de dos series de reacciones que componen la fotosíntesis. En estas reacciones, la energía de la luz solar se absorbe y se convierte en energía química que se almacena en el ATP y la NADPH. (6.3)

**Reacciones endergónicas** Reacciones que son termodinámicamente desfavorables y no pueden ocurrir espontáneamente, poseyendo un valor de $+\Delta G$ (positivo). (3.2)

**Reacciones endotérmicas** Aquellas que absorben calor en condiciones de presión y temperatura dadas. (3.1)

**Reacciones espontáneas** Reacciones termodinámicamente favorables, capaces de avanzar sin alguna entrada de energía externa. (3.1)

**Reacciones exergónicas** Reacciones que son termodinámicamente favorables, que poseen un valor de $-\Delta G$ (negativo). (3.2)

**Reacciones exotérmicas** Aquellas que liberan calor en condiciones de presión y temperatura dadas. (3.1)

**Reacciones independientes de la luz** (**reacciones oscuras**) Segunda de las dos series de reacciones que componen la fotosíntesis. En estas reacciones los carbohidratos se sintetizan a partir del dióxido de carbono, utilizando la energía almacenada en las moléculas de ATP y NADPH que se formaron en las reacciones dependientes de la luz. (6.3)

**Receptor** Cualquier sustancia que pueda unirse a una molécula específica (ligando), conduciendo a menudo a la captación o transducción de señales. (4.1, 15.1)

**Receptor de células T (TCR)** Proteínas presentes en la superficie de los linfocitos T que median la interacción con antígenos unidos a células específicas. Al igual que la inmunoglobulina de las células B, estas proteínas se forman mediante un proceso de reorganización del DNA que genera un sitio específico de combinación de antígenos. Los TCR constan de dos subunidades, cada una de las cuales contiene una variable y un dominio constante. (17.6)

**Receptor de SRP** Situado dentro de la membrana del retículo endoplásmico, el receptor de SRP se une específicamente con el complejo de ribosomas de SRP. (8.4)

**Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)** Un grupo de receptores relacionados que abarcan la membrana plasmática siete veces. La unión del ligando a su receptor específico provoca un cambio en la conformación del receptor, que aumenta su afinidad por una proteína G heterotrimérica que inicia una respuesta dentro de la célula. (15.3)

**Receptores tipo Toll (TLR)** Un tipo de receptor de patógeno del sistema inmune innato. Los seres humanos expresan al menos 10 TLR funcionales, todos los cuales son proteínas transmembrana presentes en las superficies de muchos tipos diferentes de células. (17.1)

**Recombinación genética (*crossing over*)** Reasignación de los genes en los cromosomas (lo que interrumpe los grupos de enlace) que se produce durante la meiosis como resultado de la rotura y la reunión de segmentos de cromosomas homólogos. (10.4)

**Reconstrucción de una sola partícula** Una técnica que emplea la criomicroscopía electrónica para visualizar y analizar numerosas macromoléculas purificadas (vistas como partículas) para resolver la estructura de una macromolécula o complejo macromolecular. (18.16)

**Recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración** (**FRAP**) Técnica para estudiar el movimiento de los componentes de la membrana que consta de tres pasos: 1) vincular los componentes celulares a un tinte fluorescente, 2) blanquear una parte de la célula en forma irreversible (eliminar la fluorescencia visible), 3) monitorear la reaparición de la fluorescencia en la parte blanqueada de la célula (debido al movimiento aleatorio de los componentes teñidos con fluorescencia desde el exterior del área blanqueada). (4.7)

**Red *cis* Golgi (CGN)** La cara *cis*-mayor del orgánulo que se compone de una red interconectada de túbulos ubicada en la cara de entrada más cercana al retículo endoplásmico. Se cree que la CGN funciona principalmente como una estación de clasificación, que distingue entre las proteínas que se enviarán de regreso al retículo endoplásmico y las que pueden continuar a la siguiente estación Golgi. (8.9)

**Red *trans* Golgi (TGN)** Una red de elementos tubulares interconectados en el extremo *trans* del complejo de Golgi, que clasifica y ataca las proteínas para su entrega a su destino celular o extracelular definitivo. (8.9)

**Regiones no traducidas** (**UTR**) Segmentos no codificantes contenidos en los extremos 5′ y 3′ de los mRNA. (12.19)

**Remoción y reparación de base (BER)** Un mecanismo de cortar y parchear para la eliminación de nucleótidos alterados en el DNA, por ejemplo, uracilo (formado a partir de citosina) y 8-oxoguanina. (13.8)

**Renaturalización** Reasociación de cadenas simples complementarias de una doble hélice de DNA que se había desnaturalizado previamente. (10.8)

**Reparación de desajustes (MMR)** Sistema de reparación de DNA que elimina las bases no coincidentes que son incorporadas por la DNA polimerasa y escapan a la corrección de pruebas de la enzima exonucleasa. (13.8)

**Reparación de división de nucleótidos (NER)** Un mecanismo de corte y parche para eliminar del DNA una variedad de lesiones voluminosas; por ejemplo, dímeros de pirimidina, causados por la radiación ultravioleta. (13.8)

**Repeticiones tándem** Clase de secuencias de DNA repetidas que incluye DNA satélites, minisatélites y microsatélites. (10.8)

**Réplica** Molde de metal-carbono de una superficie de tejido usado en microscopía electrónica. Las variaciones en el grosor del metal en diferentes partes de la réplica causan variaciones en el número de electrones penetrantes que llegan a la pantalla de visualización. (18.5)

**Réplica de congelación-fractura** Técnica en la que una muestra de tejido se congela primero y luego se golpea con una cuchilla que fractura el bloque de tejido a lo largo de las líneas de menor resistencia, lo que a menudo resulta en una línea de fractura entre las dos hojas de la bicapa lipídica; después se deposita metal en las superficies expuestas para crear una réplica sombreada, que se analiza mediante microscopía electrónica. (14.4, 18.5)

**Replicación del DNA** El proceso mediante el cual el DNA de una célula se copia antes de la división celular. (13.1)

**Represor** Una proteína reguladora del gen que se enlaza al DNA e inhibe la transcripción. (12.1)

**Resolución** La capacidad de ver dos puntos vecinos en el campo visual como entidades diferentes. (18.1)

**Respuesta al choque térmico** Activación de la expresión de una amplia gama de genes en respuesta a la elevación de la temperatura. Los productos de estos genes, incluidas las chaperonas moleculares, ayudan al organismo a recuperarse de los efectos dañinos de la temperatura elevada. (EP2.14)

**Respuesta de proteína no desplegada** (**UPR**) Una respuesta integral que ocurre en células cuyas cisteRNA del retículo endoplásmico (ER) contienen una concentración excesivamente alta de proteínas no desplegadas o mal plegadas. Los sensores que detectan esta situación desencadenan una ruta que conduce a la síntesis de proteínas (por ejemplo, chaperonas moleculares) que pueden aliviar el estrés en el ER. (8.7)

**Respuesta inmune adaptativa** Una respuesta específica a un patógeno que requiere una exposición previa a ese agente. Incluye respuestas mediadas por anticuerpos y linfocitos T. (17.1)

**Respuesta inmune innata** Una respuesta no específica a un patógeno que no requiere exposición previa a ese agente, incluye respuestas mediadas por células NK, complementos, fagocitos e interferón. (17.1)

**Respuestas inmunitarias** Las respuestas provocadas por las células del sistema inmunitario al entrar en contacto con materiales extraños, incluidos los patógenos invasores. Incluye respuestas innatas y adaptativas. Las respuestas inmunitarias adaptativas se pueden dividir en respuestas primarias, que siguen a la exposición inicial a un antígeno, y las respuestas secundarias que siguen a la re-exposición a ese antígeno. (17.1)

**Retículo endoplásmico** (**endoplasmático**) **(ER)** Un sistema de túbulos, cisteRNA y vesículas, que divide el contenido de líquido del citoplasma en un espacio luminal dentro de la membrana del retículo endoplásmico, y un espacio citosólico fuera de las membranas. (8.3)

**Retículo endoplásmico liso (SER)** Parte del retículo endoplásmico que no tiene ribosomas unidos. Los elementos membranosos del SER son típicamente tubulares, y forman un sistema de interconexión de tuberías que se curvan a través del citoplasma en el que ocurren. Las funciones del SER varían de una célula a otra, e incluyen la síntesis de hormonas esteroides, la desintoxicación de una amplia variedad de compuestos orgánicos, la movilización de la glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato y el secuestro de iones de calcio. (8.3)

**Retículo endoplásmico rugoso (RER)** Parte del retículo endoplásmico que tiene ribosomas unidos. El RER aparece como un extenso orgánulo membranoso compuesto principalmente de sacos aplanados (cisteRNA) separados por un espacio citosólico. Las funciones del RER incluyen la síntesis de proteínas secretoras, proteínas lisosómicas, proteínas integrales de membrana y lípidos de membrana. (8.3)

**Retículo sarcoplásmico (SR)** Un sistema de membranas SER citoplásmicas que almacenan $Ca^{2+}$ en células musculares y forman una cubierta membranosa alrededor de la miofibrilla. (9.12)

**Retrotransposones** Elementos transponibles que requieren de la transcriptasa inversa para sus movimientos dentro del genoma. (10.11)

**Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP)** El resultado de la transcripción de cada hnRNA que se asocia con una variedad de proteínas; la hnRNP representa el sustrato para las reacciones de procesamiento que siguen. (11.7)

**Riboswitches (singular riboswitch)** Secuencias dentro de los mRNA que, una vez unidas a un metabolito, experimentan un cambio en su conformación plegada que les permite alterar la expresión de un gen involucrado en la producción de ese metabolito. La mayoría de los riboswitches suprimen la expresión génica bloqueando la terminación de la transcripción, o el inicio de la traducción. (12.1)

**Ribozima** Una molécula de RNA que funciona como un catalizador en las reacciones celulares. (2.18, 11.7)

**RNA mensajero** (**mRNA**) La molécula intermediaria entre un gen y el polipéptido que codifica. El RNA mensajero se ensambla como una copia complementaria de una de las dos hebras de DNA que codifica el gen. (11.1)

**RNA nucleares heterogéneos** (**hnRNA**) Un gran grupo de moléculas de RNA que comparten las siguientes propiedades: 1) tienen grandes pesos moleculares (hasta aproximadamente 80S, o 50 000 nucleótidos); 2) representan muchas secuencias de nucleótidos diferentes; y 3) se encuentran solo en el núcleo. Incluye los pre-mRNA. (11.5)

**RNA polimerasas dependientes de DNA** (**RNA polimerasas**) Las enzimas responsables de la transcripción, tanto en células procariotas como en eucariotas. (11.2)

**RNA ribosómicos** (o **rRNA**) Los RNA de un ribosoma. Los rRNA reconocen y se unen a otras moléculas, proporcionan un soporte estructural y catalizan la reacción química en la que los aminoácidos se unen de forma covalente entre sí. (11.1)

**Roturas de doble cadena** (**DSB**) Daños en el DNA que a menudo resultan de la radiación ionizante que involucra una fractura de ambas cadenas de la doble hélice. Las DSB pueden ser debilitantes para una célula, y al menos dos sistemas diferentes de reparación están dedicados a su arreglo. (13.8)

**Ruta endocítica** Ruta para mover materiales desde el exterior de la célula (y desde la superficie de la membrana de la célula) a compartimientos como endosomas y lisosomas, ubicados en el interior de la célula. (8.1)

## S

**Sarcómeros** Unidades contráctiles de miofibrillas, dotadas de un patrón característico de bandas y rayas, que dan a las células del músculo esquelético su apariencia estriada. (9.12)

**Saturación** Una condición en la que cada molécula de una enzima o transportador está unida a su molécula de sustrato, por lo que agregar más sustrato no tiene un efecto adicional en la velocidad de reacción o transporte. (4.13)

**Sección** Una rebanada muy delgada de tejido. (18.2)

**Secreción constitutiva** Descarga de materiales sintetizados en la célula en el espacio extracelular de manera continua. (8.1)

**Secreción regulada** Descarga de materiales sintetizados en la célula que se han almacenado en gránulos secretores, unidos a la membrana en las regiones periféricas del citoplasma, y que ocurre en respuesta a un estímulo apropiado. (8.1)

**Secretado** Descargado fuera de la celda. (8.1)

**Secuencia de consenso** La versión más común de una secuencia conservada. La secuencia TTGACA de un promotor bacteriano (conocido como el elemento –35) es un ejemplo de una secuencia de consenso. (11.3)

**Secuencia de señales** Serie especial de aminoácidos localizada en la porción N-terminal de las proteínas de nueva formación, que desencadena la unión del ribosoma formador de proteínas a una membrana del retículo endoplásmico ER, y el movimiento del polipéptido naciente hacia el espacio cisternal del ER. (8.4)

**Secuenciación RNA** Análisis de los patrones de expresión génica mediante la determinación de la secuencia de RNA aislada de una célula, lo que permite determinar el número de transcripciones para cada gen en el genoma. (12.10)

**Secuencias intrónicas (o interventoras)** Regiones del DNA que se encuentran entre las secuencias de codificación de un gen y que, por tanto, faltan en el mRNA correspondiente. (11.6)

**Segunda ley de la termodinámica** Una medida de cuán fuertemente dos moléculas se pueden enlazar entre sí. (3.1)

**Segundo mensajero** Una sustancia que se forma en la célula como resultado de la unión de un primer mensajero —una hormona, u otro ligando— a un receptor en la superficie externa de la célula. (15.1)

**Selectinas** Una familia de glicoproteínas integrales de membrana que reconocen y se unen a disposiciones específicas de grupos de carbohidratos que se proyectan desde la superficie de otras células. (7.7)

**Semiconservativa** Replicación en la que cada célula hija recibe una hebra de la hélice DNA parental. (13.1)

**Semipermeable** La propiedad de la membrana de ser libremente permeable al agua mientras permite un paso mucho más lento a los pequeños iones y solutos polares. (4.10)

**Señal de localización nuclear (NLS)** Secuencia de aminoácidos en una proteína, que es reconocida por un receptor de transporte y conduce a la translocación de la proteína desde el citoplasma al núcleo. (12.2)

**Señalización celular** Comunicación en la que la información se transmite a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula, y a menudo hacia el núcleo celular, mediante una serie de interacciones moleculares. (15.1)

**Señalización transmembrana** Transferencia de información a través de la membrana plasmática. (7.10)

**Silenciamiento RNA** Un proceso en el que los pequeños RNA no codificantes, típicamente derivados de precursores más largos de doble hebra, desencadenan una inhibición específica de la secuencia de la expresión génica. (11.10)

**Sinapsis (a)** La unión especializada de una neurona con su célula objetivo. (4.18) **(b)** El proceso por el cual los cromosomas homólogos se unen entre sí durante la meiosis. (14.13)

**Síndrome de Usher** Un trastorno genético caracterizado por discapacidad auditiva y visual. (7.7)

**Sistema de levadura de dos híbridos** Una técnica utilizada para buscar interacciones proteína-proteína. Depende de la expresión de un gen informador como la β-galactosidasa, cuya actividad se controla fácilmente mediante una prueba que detecta un cambio de color cuando la enzima está presente en una población de células de levadura. (18.12)

**Sistema endomembrana** Grupo funcional y estructuralmente interrelacionado de orgánulos citoplásmicos membranosos que incluyen el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, los endosomas, los lisosomas y las vacuolas. (8.1)

**Sistema inmunológico** Sistema fisiológico que consiste en órganos, tejidos dispersos y células independientes que protegen al cuerpo de patógenos invasores y materiales extraños. (17.1)

**Sistema libre de células** Un sistema experimental para estudiar las actividades celulares, que no requieren células enteras. Es típico que tales sistemas contengan una preparación de proteínas purificadas y/o fracciones subcelulares, y son susceptibles de manipulación experimental. (8.2)

**Sitio A (aminoacilo)** sitio donde el aminoacil-tRNA entra en el complejo ribosoma-mRNA. (11.16)

**Sitio activo** La parte de una molécula de enzima que participa directamente en el enlace del sustrato. (3.5)

**Sitio alostérico** Una región de una proteína que hace que la proteína cambie su conformación cuando se enlaza a otra molécula. (3.12)

**Sitio E (salida)** Sitio de unión del tRNA sobre el ribosoma, ocupado por un tRNA después que ha transferido su aminoácido a la cadena peptídica en crecimiento, pero antes de ser liberado del ribosoma. (11.16)

**Sitio P** (**peptidil**) Sitio en el ribosoma desde el cual el tRNA dona aminoácidos a la cadena polipeptídica en crecimiento. (11.16)

**Sitios de empalme** Los extremos 5′ y 3′ de cada intrón. (11.7)

**SNARE** Proteínas clave que median en el proceso de fusión de membrana. Las **t-SNARE** se encuentran en las membranas de los compartimientos de destino. Las **v-SNARE** se incorporan en las membranas de las vesículas de transporte durante el brote. (8.13)

**snRNP** Partículas diferenciadas de ribonucleoproteína contenidas en los espliceosomas, llamadas así porque están compuestas por snRNA unidos a proteínas específicas. (11.7)

**Subunidad** Una cadena polipeptídica que se asocia con otras cadenas (subunidades) para formar una proteína completa o un complejo de proteínas. (2.11)

**Súper enrollada** Una molécula de DNA que tiene más (o menos) de 10 pares de bases por giro de la hélice. (10.7)

**Superfamilia de inmunoglobulinas** (**IgSF**) Una amplia variedad de proteínas que contienen dominios compuestos por 70 a 110 aminoácidos, homólogos a los dominios que forman las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos generados por la sangre. (7.7, 17.1)

**Sustitución** (**turnover**) La destrucción regulada de los materiales celulares y su sustitución. (8.15)

**Sustrato** El reaccionante unido por una enzima. (3.5)

**Sustratos del receptor de insulina** (**IRS**) Sustratos de proteína, que cuando se fosforilan en respuesta a la insulina, se unen y activan una variedad de efectores "de corriente abajo". (15.12)

## T

**Tapa de metilguanosina** Modificación del extremo 5′ de una molécula precursora de mRNA, de manera que la terminal "invertida" de la guanosina se metila en la posición 7′ en su base de guanina, mientras que el nucleótido en el lado interno del puente trifosfato se metila en la posición 2′ de la ribosa. Esta tapa evita

que el extremo 5′ del mRNA sea digerido por las nucleasas, ayuda en el transporte del mRNA fuera del núcleo, y desempeña un papel en el inicio de la traducción del mRNA. (11.7)



**Tejido conectivo** Tejido que consta en gran parte de una variedad de fibras diferentes que interactúan entre sí de maneras específicas. La capa más profunda de la piel (la dermis) es un tipo de tejido conectivo. (7.1)

**Tejido epitelial** Tejido compuesto de células muy compactas que recubren los espacios dentro del cuerpo. La capa externa de la piel (la epidermis) es un tipo de tejido epitelial. (7.1)

**Telofase** La etapa final de la mitosis donde las células hijas regresan a la condición de interfase: el huso mitótico se desmonta, las reformas de la envoltura nuclear y los cromosomas se dispersan cada vez más hasta que desaparecen de la vista bajo el microscopio. (14.11)

**Telomerasa** Una enzima novedosa que puede agregar nuevas unidades repetidas de DNA al extremo 3′ de la cadena saliente de un telómero. La telomerasa es una transcriptasa inversa que sintetiza el DNA usando una plantilla de RNA. (12.5)

**Telómero** Un tramo inusual de secuencias de DNA repetidas, que forma una "tapa" en cada extremo de un cromosoma. (12.5)

**Temperatura de transición** La temperatura a la cual una membrana se convierte de un estado fluido a un gel cristalino, cuando el movimiento de la molécula de lípido se reduce considerablemente. (4.6)

**Teoría celular** Teoría de la organización biológica, que tiene tres principios: todos los organismos están formados por una o más células; la célula es la unidad estructural de la vida; las células solo surgen de la división de células preexistentes. (1.1)

**Teoría de la selección clónica** Teoría bien apoyada de que los linfocitos B y T desarrollan su capacidad para producir anticuerpos específicos o receptores de células T antes de la exposición al antígeno. Si un antígeno ingresa al cuerpo, puede interactuar específicamente con los linfocitos B y T que tienen receptores complementarios. La interacción entre el antígeno y los linfocitos B o T conduce a la proliferación de los linfocitos para formar un clon de células capaces de responder a ese antígeno específico. (17.2)

**Teoría de los endosimbiontes** Propuesta que se basa en evidencia considerable de que las mitocondrias y los cloroplastos surgieron de procariotas simbióticos, que se asentaron dentro de una célula huésped primitiva. (EP 1.9)

**Termodinámica** Estudio de los cambios de energía que acompañan los eventos en el universo físico. (3.1)

**Tilacoides** Sacos membranosos aplanados, formados por la membrana interna G del cloroplasto, que contienen la maquinaria de transducción de energía para la fotosíntesis. (6.2)

**Tinción negativa** Procedimientos en los que se acumulan depósitos de metales pesados en todas partes de la rejilla del espécimen, excepto en la ubicación de materiales de partículas muy pequeñas, incluidos los agregados de alto peso molecular como virus, ribosomas, enzimas multisubunitivas, elementos citoesqueléticos y complejos de proteínas. (18.5)

**Tipo natural** La cepa original de un organismo vivo del cual se crían otros organismos para investigación. (10.4)

**Tiroiditis** Una enfermedad que se desarrolla a partir de un ataque inmunitario contra una o más proteínas de la tiroides, que conduce a la destrucción de la glándula tiroides y al hipotiroidismo. (17.3)

**Tonoplasto** La membrana que delimita la vacuola de una célula vegetal. (8.16)

**Topoisomerasas** Enzimas encontradas tanto en células procariotas como en eucariotas, que pueden cambiar el estado súper enrollado del dúplex de DNA. Son esenciales en procesos como la replicación y transcripción de DNA, que requieren que el dúplex del DNA se desenrolle. (10.7)

**Traducción genética** Síntesis de proteínas en el citoplasma utilizando la información codificada por un mRNA (11.1, 11.8)

**Transcripción** La formación de un RNA complementario a partir de una plantilla de DNA. (11.1)

**Transcriptasa inversa** Una polimerasa DNA, RNA-dependiente. Una enzima que utiliza el RNA como plantilla para sintetizar una cadena complementaria de DNA. [Una enzima que se encuentra en los virus que contienen RNA y se usa en el laboratorio para sintetizar cDNA.] (10.11)

**Transcripto primario (o pre-RNA**) La molécula de RNA inicial sintetizada a partir del DNA, equivalente en longitud al DNA del cual se transcribió. Es típico que las transcripciones primarias tengan una existencia fugaz, siendo procesadas en RNA más pequeños y funcionales por una serie de reacciones de "cortar y pegar". (11.3)

**Transcriptoma** El inventario completo de los RNA transcritos por una célula, tejido u organismo en particular. (11.13)

**Transducción** La incorporación de un gen en un genoma celular por medio de un virus. (3.1, 18.24)

**Transducción de señales** El proceso general en el que la información transportada por las moléculas del mensajero extracelular se traduce en cambios que ocurren dentro de una célula. (4.1, 15.1)

**Transfección** Un proceso mediante el cual el DNA desnudo se introduce en células cultivadas, lo que generalmente conduce a la incorporación del DNA en el genoma celular y a su posterior expresión. (18.24)

**Transfer RNA** (**tRNA**) Una familia de RNA pequeños que traduce la información codificada en el "alfabeto" de nucleótidos de un mRNA en el "alfabeto" aminoácido de un polipéptido. (11.1)

**Transgén** Un gen que se ha incorporado de manera estable en un genoma celular por el proceso de transfección. (18.24)

**Transición epitelio-mesenquimal** (**ETM**) Un proceso en el que las células epiteliales se desprenden de las células vecinas y migran, formando células madre mesenquimales. Estas células pueden diferenciarse en una variedad de tipos de células. (7.7)

**Translocación (a)** Una aberración cromosómica que se produce cuando todo o parte de un cromosoma se une a otro cromosoma. (12.6) **(b)** El paso en la traducción genética durante el cual el ribosoma se mueve de un codón al siguiente. (11.17)

**Translocación co-traduccional** El movimiento de un péptido naciente a través de un canal transmembrana, y hacia el espacio cisternal del retículo endoplásmico, a medida que se sintetiza en el ribosoma (8.4)

**Translocón** Un canal revestido de proteínas incrustado en la membrana del retículo endoplásmico (ER); el polipéptido naciente es capaz de moverse a través del translocón en su paso desde el citosol hasta el lumen ER. (8.4)

**Transportador facilitador** Una proteína transmembrana que se une a una sustancia específica, y al hacerlo cambia la conformación para facilitar la difusión de la sustancia a través de su gradiente de concentración. (4.13)

**Transporte activo** El proceso que requiere energía en el que una sustancia se une a una proteína transmembrana específica, cambiando su conformación para permitir el paso de la sustancia a través de la membrana contra el gradiente electroquímico de esa sustancia. (4.14)

**Transporte de electrones o cadena respiratoria** Portadores de electrones integrados en membranas, que aceptan electrones de alta energía y reducen secuencialmente el estado de energía de los electrones a medida que pasan a través de la cadena, con el resultado neto de capturar energía para ser usada en la síntesis de ATP u otro almacenamiento de energía molecular. (5.4)

**Transporte intraflagelar** (**IFT**) Un proceso en el cual las partículas se mueven en ambas direcciones entre la base de un flagelo o cilio y su punta. La fuerza que impulsa el IFT es generada por proteínas motoras que rastrean los dobletes periféricos del axonema. (9.7)

**Transposición** Movimiento de segmentos de DNA de un lugar en un cromosoma a un sitio completamente diferente, que a menudo afecta la expresión génica. (10.11)

**Transposones** Segmentos de DNA capaces de moverse de uno a otro lugar en el genoma. (10.11)

**Trastorno de almacenamiento lisosomal** Enfermedad caracterizada por la deficiencia de una enzima lisosomal, y la correspondiente acumulación de un sustrato no degradado. (HP8.12)

**Triacilgliceroles** Polímeros que consisten en un esqueleto de glicerol unido por enlaces éster a tres ácidos grasos, comúnmente llamados grasas. (2.7)

**Túbulos transversales** (**T**) Pliegues de membrana a lo largo de los cuales el impulso generado en una célula del músculo esquelético se propaga hacia el interior de la célula. (9.12)

## U

**Ubiquinona** Un componente de la cadena de transporte de electrones; la ubiquinona es una molécula soluble en lípidos que contiene una larga cadena hidrófoba, compuesta por unidades isoprenoides de cinco carbonos. (5.4)

**Ubiquitina** Una proteína pequeña y altamente conservada que está vinculada a proteínas dirigidas a la internalización por endocitosis, o a la degradación en proteasomas. (12.21)

**Último ancestro común eucariota (LECA)** La especie que fue el ancestro común de todas las especies eucariotas existentes; se cree que es un organismo unicelular que ya tenía todas las características biológicas celulares típicas de las células eucariotas. (EP 1.9)

**Umbral** El punto durante la despolarización de una celda excitable los canales de sodio dependientes de voltaje se abren, con la afluencia de Na+ resultante dando lugar a una breve inversión en el potencial de membrana. (4.16)

**Unidad de fotosíntesis** Un grupo de varios cientos de moléculas de clorofila que actúan juntas para atrapar fotones y transferir energía a la molécula de pigmento en el centro de reacción. (6.5)

**Unidad de transcripción** El segmento correspondiente de DNA en el que se transcribe una transcripción primaria. (11.3)

**Unión neuromuscular** El punto de contacto de un extremo de un axón con una fibra muscular, la unión neuromuscular es un sitio de transmisión de impulsos nerviosos desde el axón hasta la fibra muscular a través de la hendidura sináptica. (4.18, 9.12)

**Uniones adherentes** (*zonula adherens* o desmosomas en bandas) Las uniones adherentes son un tipo de unión adhesiva especializada, particularmente común en los epitelios. Las membranas plasmáticas en esta región están separadas por 20 a 35 nm y son sitios donde se concentran las moléculas de cadherina. Las células se mantienen unidas por enlaces entre los dominios extracelulares de las moléculas de cadherina que unen el gap entre las células vecinas. (7.9)

**Uniones apretadas** Contactos especializados que se producen justo en el extremo apical del complejo de unión entre las células epiteliales adyacentes. Las membranas adyacentes hacen contacto en puntos intermitentes, donde las proteínas integrales de las dos membranas adyacentes se encuentran. (7.11)

**Uniones gap** Sitios entre las células animales especializados para la comunicación intercelular. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes se encuentran a aproximadamente 3 nm una de la otra, y el gap está atravesado por "tuberías" muy finas o conexiones que permiten el paso de pequeñas moléculas. (7.12)

## V

**Vacuola** Una estructura única rellena de líquido, limitada por membrana, que comprende hasta el 90% del volumen de muchas células vegetales. (8.16)

**Variación de energía libre (ΔG)** El cambio de la cantidad de energía disponible para realizar trabajo durante un proceso. (3.2)

**Variación de energía libre estándar (ΔG°′)** El cambio en la energía libre cuando un mol de cada reactivo se convierte en un mol de cada producto en condiciones estándar definidas: temperatura de 298 K y presión de 1 atm. (3.2)

**Velocidad máxima (*Vmax*)** La velocidad más alta que se alcanza para una reacción dada catalizada por enzimas; ocurre cuando la enzima está saturada con el sustrato. (3.7)

**Vesículas recubiertas** Vesículas que brotan de un compartimiento de membrana y es típico que posean una capa de proteínas de múltiples subunidades que promueve el proceso de brote y se unen a proteínas de membrana específicas. Las vesículas revestidas con **COPI-**, **COPII-** y **clatrina** son las vesículas revestidas mejor caracterizadas. (8.10)

**Vesículas sinápticas** Los sitios de almacenamiento de neurotransmisores dentro de los botones terminales de un axón neuronal. (4.18)

**Vía anabólica** Una vía metabólica que resulta en la síntesis de productos relativamente complejos. (3.9)

**Vía anaeróbica** Vía enzimática para generar ATP a partir de glucosa sin la necesidad de oxígeno. (3.10)

**Vía $C_4$** Vía alternativa para la fijación de carbono utilizando fosfoenolpiruvato como aceptor de $CO_2$ para producir compuestos de cuatro carbonos (de predominio malato y oxaloacetato). (6.10)

**Vía catabólica** Una vía metabólica en la cual moléculas relativamente complejas se descomponen en productos más simples. (3.9)

**Vía de biosíntesis (vía secretora)** Ruta a través del citoplasma mediante la cual los materiales se sintetizan en el retículo endoplásmico o en el complejo de Golgi, se modifican durante su paso a través del complejo de Golgi, y se transportan dentro del citoplasma a destinos diversos como la membrana plasmática, un lisosoma, o una gran vacuola de una célula vegetal. El término alterno **vía secretora** se ha usado porque muchos de los materiales sintetizados en la vía están destinados a ser descargados (secretados) fuera de la célula. (8.1)

**Vía metabólica** Una serie de reacciones químicas que resultan en la síntesis de un producto final importante para la función celular. (2.5, 3.9)

**Vía secretora** (**vía de biosíntesis**) Ruta a través del citoplasma mediante la cual los materiales se sintetizan en el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi, se modifican durante el paso a través del complejo de Golgi, y se transportan dentro del citoplasma a varios destinos como la membrana plasmática, un lisosoma, o una gran vacuola de una célula vegetal. Muchos de los materiales sintetizados en el retículo endoplásmico en el complejo de Golgi están destinados a ser descargados fuera de la célula; de ahí que se use el término vía secretora. (8.1)

**Vías de señalización** Las autopistas de información de la célula. Cada una consiste en una serie de proteínas distintas que operan en secuencia. Cada proteína en la vía actúa alterando la conformación de la proteína corriente abajo en la serie. (15.1)

**Vida media** Una medida de la inestabilidad de un radioisótopo o, de forma equivalente, la cantidad de tiempo requerido para que la mitad del material radiactivo se desintegre. (18.8)

**Virión** La forma que un virus asume fuera de una célula, que consiste en un núcleo de material genético rodeado de una proteína o cápsula de lipoproteína. (1.8)

**Viroides** Patógenos pequeños, obligatoriamente intracelulares, que a diferencia de los virus consisten únicamente en un círculo de material genético no recubierto, el RNA. (1.8)

**Virus** Pequeños patógenos obligatoriamente intracelulares, que no se consideran vivos porque no se pueden dividir directamente como lo exige la teoría celular de la vida. (1.8)

**Virus de tumor DNA** Virus capaces de infectar células de vertebrados, transformándolos en células cancerosas. Los virus de DNA tienen DNA en las partículas maduras de virus. (16.2)

**Virus de tumor RNA** Retrovirus capaces de infectar células de vertebrados, transformándolas en células cancerosas. Los virus de RNA tienen RNA en las partículas de los virus maduros. (16.2)

# Lecturas adicionales

(Las lecturas adicionales para cada capítulo se pueden encontrar en el sitio Web complementario del libro del estudiante www.wiley.com/college/karp)


## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 1

### Referencias generales sobre microbiología y virología

Knipe, D. M., *et al*. *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott; 2007.

Madigan, M. T., *et al*. *Brock-Biology of Microorganisms.* 13th ed. Benjamin Cummings; 2011.

### Otras lecturas

Buchen, L. The new germ theory. *Nature* 2010;468:492-495. [microbios GI]

Cherry, A. B. C. & Daley, G. Q. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* 2012;148:1110-1122.

Cho, M. K. & Relman, D. A. Synthetic "life," ethics, national security, and public discourse. *Science* 2010;329:38-39.

Hanna, J. H., *et al*., Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 2010;143:508-525.

Hayden, E. C. Life is complicated. *Nature* 2010;464:664-667.

Hayden, E. C. The growing pains of pluripotency. *Nature* 2011;473:272-274.

Janssens, S. Stem cells in the treatment of heart disease. *Ann Rev Med* 2010;61:287-300.

Keasling, J. D. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* 2010;330:1355-1358.

Koonin, E. V. The incredible expanding ancestor of eukaryotes. *Cell* 2010;140:606-608.

Mascarelli, A. Low life. *Nature* 2009;459:770-773. [microbios del suelo]

Nicholas, C. R. & Kriegstein, A. R. Cell reprogramming gets direct. *Nature* 2010;463:1031-1032.

Pera, M. F. The dark side of pluripotency. *Nature* 2011;471:46-47

Pennisi, E. Synthetic genome brings new life to bacterium. *Science* 2010;328:958-959.

Shevde, N. Flexible friends. *Nature* 2012 March 1;483:S22-S26. [reprogramación de la célula]

Sonnenburg, J. L. Genetic pot luck. *Nature* 2010;464:837-838. [microbios GI]

Tiscornia, G., *et al*., Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using iPS cells. *Nature Med* 2011;17:1570-1576.

Wu, S. M. & Hochedlinger, K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biol* 2011;13:497-505.

Yamanaka, S. & Blau, H. M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010;465:704-712.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 2

### Bioquímica general

Berg, J. M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. *Biochemistry*. 7th ed. W. H. Freeman; 2010.

Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. W. H. Freeman; 2009.

Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry*. 4th ed. Wiley; 2010.

### Otras lecturas

Bornscheuer, U. T., *et al*. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 2012;485:185-194.

Brody, H., *et al*. Nature outlook: Alzheimer's disease. *Nature* 2011;475(7/14 issue):S1-S22.

Chouard, T. Breaking the protein rules. *Nature* 2011;471:151-153.

Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Revs Drug Disc* 2010;9:387-399.

Cushman, M., *et al*. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Science* 2010;123:1191-1201.

Dalby, P. A. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2011;21:473-480.

Hekimi, S., *et al*. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 2011;21:569-575.

Huang, Y. & Mucke, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 2012;148:1204-1222.

Itzhaki, L. S., *et al*. Protein folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* 2012;22, #1.

Miller, G. Alzheimer's biomarker initiative hits its stride. *Science* 2009;326:386-389.

Karran, E., *et al*. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Revs Drug Disc* 2011;10:698-712.

Pearson, H. Raising the dead. *Nature* 2012;483:390-393. [evolución de la proteína ancestral]

Sosnick, T. R. & Barrick, D. The folding of single domain proteins—have we reached a consensus? *Curr Opin Struct Biol* 2011;21:12-24.

Thompson, C. B. Attacking cancer at its root. *Cell* 2009;138:1051-1054. [desarrollo Gleevek]

Vinson, V. J., *et al*. Proteins in motion. *Science* 2009;324:197-215.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 3

Benkovic, S. J. & Hammes-Schiffer, S. A perspective on enzyme catalysis. *Science* 2003;301:1196-1202.

Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 2009;325:1089-1093.

Hammes, G. G. *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*. Wiley; 2000.

Hammes, G. G. How do enzymes really work? *J Biol Chem* 2008;283:22337-22346.

Hardie, D. G., *et al*. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2012;13:251-262.

Harold, F. M. *The Vital Force: A Study of bioenergetics*. Freeman; 1986.

Harris, D. A. *Bioenergetics at a Glance*. Blackwell; 1995.

Jencks, W. P. From chemistry to biochemistry to catalysis to movement. *Annu Rev Biochem* 1997;66:1-18.

Kornberg, A. *For the Love of Enzymes*. Harvard; 1989.

Koshland, D. E., Jr. Crazy, but correct. *Nature* 2004; 432:447. [sobre la postulación de hipótesis de ajuste inducido]

Kraut, D. A., *et al*. Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu Rev Biochem* 2003;72:517-571.

Kraut, J. How do enzymes work? *Science* 1988;242:533-540.

Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Ann Rev Biochem* 2009;78:119-146.

Ringe, D. & Petsko, G. A. How enzymes work. *Science* 2008;320:1428-1429.

Schramm, V. L. Enzymatic transition states, transition-state analogs, dynamics, thermodynamics, and lifetimes. *Ann Rev Biochem* 2011;80:703-732.

Vrielink, A. & Sampson, N. Sub-Ångstrom resolution enzyme X-ray structures: is seeing believing? *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:709-715.

Walsh, C., *et al*. Reviews on biocatalysis. *Nature* 2001;409:226-268.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 4

Reseñas sobre membranas pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Struct Biol* issue #4.

Bogdanov, M., *et al*. Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive-inside rule. *J Biol Chem* 2009;284: 9637-9641.

Boudker, O. & Verdon, G. Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:418-426.

Bublitz, M., *et al.* P-type ATPases at a glance. *J Cell Sci* 2011;124:2515-2519.

Gadsby, D. C. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2009;10:344-352.

Khalili-Araghi, F., *et al.* Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:128-137.

Kusumi, A., *et al*. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem Sci* 2011;36:604-615.

Lee, A. G. Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends Biochem Sci* 2011;36:493=502.

London, E. Shahidullah, K. Transmembrane vs. non-transmembrane hydrophobic helix topography in model and natural membranes. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:464-472.

Morth, J. P., *et al.* A structural overview of the plasma membrane Na+, K+-ATPase and H+-ATPase ion pumps. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2011;12:60-70.

Shevchenko, A. & Simons, K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:593-598.

Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:688-699.

Tate, C. G. & Stevens, R. C., eds. Membranes. *Curr Opin Struct Biol* 2010;20(4).

von Heijne, G. Membrane-protein topology. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2006;7:909-918.

White, S. H., *et al*. Protein biophysics. *Nature* 2009;459:343-385.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 5

Chan, S. I. Proton pumping in cytochrome c oxidase: the coupling between proton and electron gating. *PNAS* 2010;107:8505-8506.

Efremov, R. G. & Sazanov, L. A. Respiratory complex I: "steam engine" of the cell. *Curr Opin Struct Biol* 2011;21:532-540.

Farmer, S. R. Obesity: Be cool, lose weight. *Nature* 2009;458:839-840. [UCP1 and BAT]

Fischer, W. W. Life before the rise of oxygen. *Nature* 2008;455:1051-1052.

Ferguson, S. J. ATP synthase: from sequence to ring size to the P:O ratio. *PNAS* 2010;107:16755-16756.

Junge, W. & Müller, D. J. Seeing a molecular motor at work. *Science* 2011;333: 704-705.

Kageyama, Y., *et al*. Mitochondrial division: molecular machinery and physiological functions. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:427-434.

Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012;148:1145-1159.

Ohnishi, T. Piston drives a proton pump. *Nature* 2010;465:428-429.

Park, C. B. & Larsson, N.-G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 2011;193:809-818.

von Ballmoos, C., *et al*. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu Rev Biophys* 2008;37:43-64.

von Ballmoos, C., *et al*. Essentials for ATP synthesis by F1-F0 ATP synthases. *Ann Rev Biochem* 2009;78:649-672.

Wallace, D. C. & Fan, W. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Develop* 2009;23:1714-1736.

Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:872-884.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 6

Allen, J. F. & Martin, W. Out of thin air. *Nature* 2007;445:610-612. [evolución de la fotosíntesis]

Eberhard, S., *et al*. The dynamics of photosynthesis. *Ann Rev Gen* 2008;42:463-515.

Nelson, N. & Ben-Shem, A. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2004;5:971-982.

Nelson, N. & Yocum, C. F. Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* 2006;57:521-565.

Shikanai, T. Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol* 2007;58:199-217.

West-Eberhard, M. J., *et al*. Photosynthesis, reorganized. *Science* 2011;332: 311-312. [evolución de C4 y las plantas CAM]

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 7

Reseñas sobre el contacto célula a célula y la matriz extracelular pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol* issue #5.

Cox, D., *et al*. Integrins as therapeutic targets. *Nature Revs Drug Disc* 2010;9:804-820.

Desai, B.V., *et al*. Desmosomes at a glance. *J Cell Sci* 2009;122:4401-4407.

Desgrosellier, J.S. & Cheresh, D.A. Integrins in cancer. *Nature Revs Cancer* 2010;10:9-22.

Harris, T.J.C. & Tepass, U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:502-514.

Kadler, K. E., *et al*. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 2007;120:1955-1958.

Kessenbrock, K., *et al*. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52-67.

Kim, C., *et al*. Regulation of integrin activation. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2011;27: 321-345.

Leckband, D.E., *et al*. Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:523-530.

Moser, M., *et al*. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 2009;324: 895-899.

Nieto, M.A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2011;27:347-376.

Schwartz, M. A. The force is with us. *Science* 2009;323:588-589. [fuerzas sobre adhesiones focales]

Shattil, S.J., *et al*. The final steps of integrin activation. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:288-300.

Sonnenberg, A. & Watt, F. M. (eds.). Número especial sobre integrinas. *J Cell Sci* 2009;122:#2.

Steed, E., *et al*. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* 2010;20:142-149.

Valastyan, S. & Weinberg, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011;147:275-292.

Zaidel-Bar, R. & Geiger, B. The switchable integrin adhesome. *J Cell Sci* 2010;123:1385-1388.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 8

Reseñas sobre endomembranas pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol* issue #4.

Boettner, D.R., *et al*. Focus on membrane dynamics. *Nature Cell Biol* 2012;14:#1.

Chacinska, A., *et al*. Importing mitocondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 2009;138:628-644.

Dalal, K. The SecY complex: conducting the orchestra of protein translocation. *Trends Cell Biol* 2011;21:506-513.

Ferguson, S.M. & De Camilli, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2012;13:75-88.
Frost, A., *et al*. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* 2009;137:191-196.
Glick, B.S. & Nakano, A. Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2009;25:113-132.
Hsu, V.W., *et al.* Getting active: protein sorting in endocytic recycling. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2012;13:323-328.
Hurley, J.H., *et al*. Membrane budding. *Cell* 2010;143:875-887.
Jensen, D. & Schekman, R. COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci* 2011;124:1-4.
Lev, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:739-750.
Libby, P., *et al*. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-325.
Pfeffer, S. & Novick, P. (eds.). Reviews on autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:#4.
Prinz, W.A. Lipid trafficking sans vesicles: where, why, how? *Cell* 2010;143:870-874.
Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT A-3 machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 2009;458:445-452.
Schmidt, O., *et al*. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2010;11:655-667.
Shao, S. & Hegde, R.S. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2011;27: 25-56.
Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2009;10:513-526.
Traub, L.M., *et al.* Reviews of endocytosis. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2009;10:#9.
Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; 334:1081-1086.
Yang, Z. Focus on autophagy. *Nature Cell Biol* 2010;12:#9.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 9

Reseñas sobre el citoesqueleto y las proteínas de motor pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol* issue #1.
Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O. Microtubule + TIPs at a glance. *J Cell Sci* 2010;123:3415-3419.
Gardel, M.L., *et. al.* Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2010;26:315-333.
Goetz, S.C. & Anderson, K.V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Revs Gen* 2010;11:331-344.
Hammer III, J.A. & Sellers, J.R. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2012;13:13-26.
Hartman, M.A. & Spudich, J.A. The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:1627-1632.
Hirokawa, N., *et al*. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2009; 10:682-696.
Kollman, J.M., *et al.* Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2011;12:709-721.
Kritikou, E., *et al*. Milestone papers on the cytoskeleton. *Nature Suppl* 2008 December.
Lindemann, C. B. & Lesich, K.A. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* 2010;123:519-528.
Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2012;13:183-194.
Pollard, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 2008;36:451-477.
Ridley, A. J. Life at the leading edge. *Cell* 2011;145:1012-1022. [migración celular]
Saxton, W. & Hollenbeck, P. J. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 2012;125:2095-2104.
Sweeney, H. L. & Houdusse, A. Structural and functional insights into the myosin motor mechanism. *Ann Rev Biophys* 2010;39:539-557.
van den Heuvel, M. G. L. & Dekker, C. Motor proteins at work for nanotechnology. *Science* 2007;317:333-336.
Walter, W. J. & Diez, S. A staggering giant. *Nature* 2012;482:44-45. [paso de dinein]
Windoffer, R., *et al*. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011;194:669-678.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 10

Reseñas sobre genomas y evolución pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Genetics Develop*, issue #6.
Barbujani, G. & Colonna, V. Human genome diversity: frequently asked questions. *Trends Gen* 2010;26:285-295.
Callaway, E. Ancient DNA reveals secrets of human history. *Nature* 2011;476: 136-137.
Cordaux, R. & Batzer, M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Revs Gen* 2009;10: 691-703.
Daly, A. K. Genome-wide association studies in pharmacogenomics. *Nat Revs Gen* 2010;11:241-246.
Frazer, K. A., *et al*. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Revs Gen* 2009;10:241-251.
Gibbons, A. Tracing evolution's recent fingerprints. *Science* 2010;329:740-742.
Gibson, G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Revs Gen* 2012;13: 135-145.
Kiezun, A., *et al*. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Gen* 2012;44:623-630.
La Spada, A. R. & Taylor, J. P. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Revs Gen* 2010;11:247-258.
Lander, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 2011;470:187-197.
Lupski, J. R., *et al*. Three perspectives on genomics and human disease. *Cell* 2011;147:32-69.
Malhotra, D. & Sebat, J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 2012;148: 1223-1241.
Manolio, T. A., *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;461:747-753.
Manolio, T. A. & Collins, F. S. The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Ann Rev Med* 2009;60:443-456.
McClellan, J. & King, M. C. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 2010;141:210-217.
Monroe, D. Genomic clues to DNA treasure sometimes lead nowhere. *Science* 2009;325:142-143.
Orr, H. T. Unstable nucleotide repeat minireview series. *J Biol Chem* 2009;284: 7405-7435.
Pennisi, E. Tales of a prehistoric human genome. *Science* 2009;323:866-871. [genoma Neandertal]
Pennisi, E. Green genomes. *Science* 2011; 332:1372-1375. [genomas de las plantas]
Vos, S. M., *et al*. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2011;12:827-841.
Yandell, M. & Ence, D. A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nature Revs Gen* 2012;13:329-342.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 11

Reseñas sobre el núcleo y la expresión génica pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol* issue #3.

Cheung, A. C. M. & Cramer, P. A movie of RNA polymerase II transcription. *Cell* 2012;149:1431-1437.

Cramer, P. & Arnold, E. (eds.). How RNA polymerases work. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:680-782.

Czech, B. & Hannon, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Revs Gen* 2011;12:19-31.

Dunkle, J. A. & Cate, J. H. D. Ribosome structure and dynamics during translocation and termination. *Ann Rev Biophys* 2010;39:227-244.

Hoskins, A. A. & Moore, M. J. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci* 2012;37:179-188.

Jackson, R. J., *et al*. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:113-127.

Jacquier, A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Revs Gen* 2009;10: 833-844.

Kawamata, T. & Tomari, Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci* 2010;35:368-376.

Klinge, S., *et al*. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci* 2012;37:189-198.

Krol, J., *et al*. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Revs Gen* 2010;11:597-610.

Kuehner, J. N., *et al*. Unraveling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2011;12:283-294.

Nudler, E. RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription. *Ann Rev Biochem* 2009;78:335-361.

Proudfoot, N. J. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Develop* 2011;25:1770-1782.

Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 2009;461:1234-1242.

Sharp, P. A., *et al*. Special review issue on RNA. *Cell* 2009;136#4.

Siomi, M. C., *et al*. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2011; 12:246-258.

van Hoof, A. & Wagner, E. J. A brief survey of mRNA surveillance. *Trends Biochem Sci* 2011;36:585-592.

Wilson, T. J. & Lilley, D. M. J. The evolution of ribozyme chemistry. *Science* 2009;323:1436-1438.

Winter, J., *et al*. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biol* 2009;11:228-234.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 12

Reseñas sobre el núcleo y la regulación génica pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol*, issue #3.

Reseñas sobre los cromosomas y la expresión génica pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Genetics and Develop*, issue #2.

Bose, T. & Gerton, J. L. Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. *J Cell Biol* 2010;189:201-210.

Bowman, G. D. Mechanisms of ATP dependant nucleosome sliding. *Curr Opin Struct Biol* 2010;20:73-81.

Bulger, M. & Groudine, M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 2011; 144:327-339.

Fabian, M. R., *et al*. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Ann Rev Biochem* 2010;79:351-379.

Farnham, P. J. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nature Revs Gen* 2009;10:605-616.

Ferguson-Smith, A. C. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nature Revs Gen* 2011;12: 565-575.

Fuda, N. J., *et al*. Nature insight: Transcribing the genome. *Nature* 2009;461: 185-223.

Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease, and inheritance. *Nature Revs Gen* 2012;13:343-357.

Grünwald, D., *et al*. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature* 2011;475:333-341.

Jiang, C. & Pugh, B. F. Nucleosome positioning and gene regulation. *Nature Revs Gen* 2009;10:161-172.

Jones, P. A. Functions of DNA methylation. *Nature Revs Gen* 2012;13:484-492.

Kugel, J. F. & Goodrich, J. A. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem Sci* 2012;37:144-151.

Li, J. & Gilmour, D. S. Promoter proximal pausing and the control of gene expression. *Curr Opin Gen Develop* 2011;21:231-235.

Luo, Z., *et al*. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nature Revs Mol Cell Biol* 2012;13:543-548.

Malik, H. S. & Henikoff, S. Major evolutionary in centromere complexity. *Cell* 2009;138:1067-1082.

Mattick, J. S., *et al*. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioess* 2009;31: 51-59.

Moazed, D. Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 2011; 146:510-518.

Nilsen, T. W. & Graveley, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010;463:457-463.

Ong, C. T. & Corces, V. G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature Revs Gen* 2011;12:283-293.

Osterhage, J. L. & Friedman, K. L. Chromosome end maintenance by telomerase. *J Biol Chem* 2009;284: 16061-16065.

Pauli, A., *et al*. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nature Revs Gen* 2011;12:136-149.

Riddihough, G., *et al*. What is epigenetics? *Science* 2010;330:611-632.

Schoenfelder, S., *et al*. The transcriptional interactome: gene expression in 3D. *Curr Opin Gen Develop* 2010;20: 127-133.

Spitz, F. & Furlong, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Revs Gen* 2012;13:613-626.

Strambio-De-Castillia, C., *et al*. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:490-501.

Suganuma, T. & Workman, J. L. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Ann Rev Biochem* 2011;80:473-499.

Taatjes, D. J. The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 2010;35:315-322.

Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Revs Gen* 2012;13: 227-232.

Weake, V. M. & Workman, J. L. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nature Revs Gen* 2010;11:426-437.

Wilson, K. L. & Berk, J. M. The nuclear envelope at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123:1973-1978.

Yamanaka, S. & Blau, H. M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010;465:704-712.

Zhou, V. W., *et al*. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Revs Gen* 2011;12:7-18.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 13

Alabert, C. & Groth, A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2012;13:153-167.

Balakrishnan, L. & Bambara, R. A. Eukaryotic lagging strand DNA replication employs a multi-pathway mechanism that protects genome integrity. *J Biol Chem* 2011;286:6865-6870.

Bernstein, K. A. & Rothstein, R. At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* 2009;137:807-810.

Broyde, S. & Patel, D. J. How to accurately bypass damage. *Nature* 2010;465: 1023-1024.

Cleaver, J. E., *et al*. Disorders of nucleotide excision repair. *Nat Revs Gen* 2009;10:756-768.

Corpet, A. & Almouzni, G. Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. *Trends Cell Biol* 2009;19:29-40.

Gilbert, D.M. Evaluating genome-scale approaches to eukaryotic DNA replication. *Nat Revs Gen* 2010;11:673-684.

Hamdan, S. M. & van Oijen, A. M. Timing, coordination, and rhythm: acrobatics at the DNA replication fork. *J Biol Chem* 2010;285:18979-18983.

Lukas, J., *et al*. More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 2011;13: 1161-1169.

Masai, H., *et al*. Eukaryotic chromosome DNA replication. Were, when, and how? *Ann Rev Biochem* 2010;79:89-130.

Méchali, M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answeres. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:728-738.

Misteli, T. & Soutoglou, E. The emerging role of nucler architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2009;10:243-254.

Ransom, M., *et al*. Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* 2010;140:183-195.

Yao, N. Y. & O'Donnell, M. Replisome structure and conformational dynamics underlie fork progression past obstacles. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:336-343.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 14

Reseñas sobre  división celular pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol*, issue #6.

Alushin, G. & Nogales, E. Visualizing kinetochore architecture. *Curr Opin Struct Biol* 2011;21:661-669.

Bloom, K. & Joglekar, A. Towards building a chromosome segregation machine. *Nature* 2010;463:446-456.

Coller, H. A. The essence of quiescence. *Science* 2011;334:1074-1075.

Compton, D. A. Mechanisms of aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23: 109-113.

Fededa, J. P. & Gerlich, D. W. Molecular A-5 control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol* 2012;14:440-447.

Handel, M. A. & Schimenti, J. C. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Revs Gen* 2010;11:124-136.

Joglekar, A. P., *et al*. Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:57-67.

Lampert, F. & Westermann, S. A blueprint for kinetochores—new insights into the molecular mechanics of cell division. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2011; 12:407-412.

Ledbetter, D. H. Chaos in the embryo. *Nat Med* 2009;15:490-491. [aneuploidía]

Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Revs Cancer* 2009;9:153-166.

Maresca, T. J. & Salmon, E. D. Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal. *J Cell Sci* 2010; 123:825-835.

Nagaoka, S. I., *et al*. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Revs Gen* 2012; 13:493-504.

Neto, H. & Gould, G. W. The regulation of abscission by multi-protein complexes. *J Cell Sci* 2011;124:3199-3207.

O'Connell, C. B., *et al*. Reviews on the kinetochore. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24:40-70.

Pollard, T. D. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 50-56.

Przewloka, M. R. & Glover, D. M. The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Ann Rev Gen* 2009;43:439-465.

Reinhardt, H. C. & Yaffe, M. B. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:245-255.

Skibbens, R. V. Buck the establishment: reinventing sister chromatid cohesion. *Trends Cell Biol* 2010;20:507-513.

Walczak, C. E., *et al*. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:91-102.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 15

Reseñas sobre regulación celular pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Cell Biol*, issue #2.

Bollen, M., *et al*. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 2010;35:450-457.

Chaudhari, N. & Roper, S. D. The cell biology of taste. *J Cell Biol* 2010;190: 285-296.

DeMaria, S. & Ngai, J. The cell biology of smell. *J Cell Biol* 2010;191:443-452.

Foster, K. G. & Fingar, D. C. mTOR: conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 2010;285:14071-14077.

Good, M. C., *et al*. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 2011;332:680-686.

Happo, L., *et al*. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:1081-1087.

Hunter, T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:140-146.

Kenyon, C. The genetics of ageing. *Nature* 2010;464:504-512.

Kim, T. H., *et al*. Guard cell signal transduction network. *Ann Rev Plant Biol* 2010;61:561-591.

Kobilka, B. K. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:213-218.

Laplante, M. & Sabatini, D. M. *Mtor* signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-294.

Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-1134.

Maxmen, A. Calorie restriction falters in the long run. *Nature* 2012;488:569.

Mendoza, M. C., *et al*. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36:320-328.

Miaczynska, M. & Bar-Sagi, D. Signaling endosomes: seeing is believing. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:535-540.

Parekh, A. B. Store-operated CRAC channels: function in health and disease. *Nature Revs Drug Disc* 2010;9:399-410.

Pearce, L. R., *et al*. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:9-22.

Rosenbaum, D. M., *et al*. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009;459:356-363.

Santner, A. & Estelle, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 2009;459: 1071-1078.

Sierra, F., *et al*. Prospects for life extension. Ann Rev Med 2009;60:457-469.

Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11: 621-632.

Taubes, G. Prosperity's plague. *Science* 2009;325:256-260. [Resistencia a la insulina]

Yarmolinsky, D. A., *et al*. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 2009;139:234-244.

Zoncu, R., *et al*. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2011; 12:21-35.

## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 16




Reseñas sobre el cáncer pueden ser encontradas cada año en *Curr Opin Gen Develop*, issue #1.

Bernards, R. It's diagnostics, stupid. *Cell* 2010;141:13-17.

Brody, H., *et al*. Nature outlook on cancer prevention. *Nature* 2011;471:3/24, S1-S24.

Cairns, R. A., *et al*. Regulation of cancer cell metabolism Nat. Revs. *Cancer* 2011;11:85-95.

Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Revs Cancer* 2010;10:51-61.

Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Deciphering the genetic landscape of cancer— from genes to pathways. *Trends Gen* 2009;25:455-464.

Cowin, P. A., *et al*. Profiling the cancer genome. *Ann Rev Genom Human Gen* 2010;11:133-159.

Dancey, J. E., *et al*. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 2012; 148:409-420.

Druker, B. J., *et al*. 3 reviews on the discovery and development of Gleevec. *Nature Med* 2009;15:1149-1161.

Farrell, A., *et al*. Focus on cancer. *Nature Med* 2011;17:#3.

Fletcher, O. & Houlston, R. S. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat Revs Cancer* 2010;10: 353-361.

Gilbertson, R. J. & Graham, T. A. Cancer: resolving the stem-cell debate. *Nature* 2012;488:462-463.

Grivennikov, S. I., *et al*. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883-899.

Haber, D. A., *et al*. The evolving war on cancer. *Cell* 2011;145:19-24.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646-674.

Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2009;10:478-487.

Huen, M. S. Y., *et al*. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:138-148.

Kaelin, W. G., Jr. & Thompson, C. B. Cancer: Clues from cell metabolism. *Nature* 2010;465:562-564.

Kruse, J. P. & Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009;137:609-622.

Kuilman, T. The essence of senescence. *Genes Develop* 2010;24:2463-2479.

Lesterhuis, W. J., *et al*. Cancer immunotherapy— revisited. *Nat Revs Drug Discov* 2011;10:591-600.

Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* 2012.482: 347-355.[miRNA]

Marshall, E., *et al*. News and reviews on cancer. *Science* 2011;331:1540-1570.

Negrini, S., *et al*. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat Revs Mol Cell Biol* 2010;11:220-228.

Schilsky, R. L. Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Revs Drug Discov* 2010;9:363-366.

Sellers, W. R. A blueprint for advancing genetics-based cancer therapy. *Cell* 2011;147:26-31.

Shackleton, M., *et al*. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 2009;138:822-829.

Venkitaraman, A., *et al*. Cancer genomics. *Curr Opin Cell Biol* 2012;1.

Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011;469:314-322.

William, W. N., Jr., *et al*. Molecular targets for cancer chemoprevention. *Nat Revs Drug Discov* 2009;8:213-224.


## LECTURAS DE TEXTO CAPÍTULO 17


Las que siguen están integradas completamente por revistas de Inmunología:

*Advances in Immunology*
*Annual Review of Immunology*
*Critical Reviews in Immunology*
*Current Opinion in Immunology*
*Immunological Reviews*
*Nature Reviews Immunology*
*Trends in Immunology*

Barreiro, L. B. & Quintana-Murci, L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nature Revs Gen* 2010;11:17-30.

Blumberg, R. S., *et al*. Focus on autoimmunity. *Nature Med* 2012;18:35-70.

Chapman, S. J. & Hill, A. V. S. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nature Revs Gen* 2012;13:175-188.

Dolgin, E. The inverse of immunity. *Nature Med* 2010;16:740-743. [enfermedad autoinmune]

Erdmann, J. Lights, camera, infection. *Nature* 2009;460:568-570.

Flajnik, M. F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Revs Gen* 2010;11:47-59.

Geissmann, F., *et al*. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010;327:656-662.

Herzog, S., *et al*. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Revs Immunol* 2009;9:195-206.

Huse, M. The T-cell-receptor signaling network. *J Cell Sci* 2009;122:1269-1273.

Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern recognition receptors in innate immunity. *Nature Immunol* 2010;11:373-384.

Kyewski, B. & Peterson, P. Aire, master of many trades. *Cell* 2010;140:24-26.

Leslie, M. Internal affairs. *Science* 2009;326:929-931. [inmunidad innata]

Mathis, D., *et al*. Reviews on autoimmunity. *Nature Immunol* 2010;11:3-46.

Medzhitov, R., *et al*. Reviews on inflammation. *Cell* 2010;140(6).

Mueller, K. L., *et al*. Número sobre inmunidad innata. *Science* 2010 Jan 15.

O'Shea, J. J. & Paul, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098-1102.

Paul, W. E. Bridging innate and adaptive immunity. *Cell* 2011;147:1212-1215.

Vivier, E., *et al*. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44-49.

Zenewicz, L. A., *et al*. Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell* 2010;140:791-797.

# Términos clave

## Capítulo 1

**Angstrom** (Å). Unidad, equivalente a 0.1 nm, que se utiliza para describir dimensiones atómicas y moleculares. (1.7)

**Células eucariotas.** Células (p. ej., plantas, animales, protistas, hongos) caracterizadas por una estructura interna basada en orgánulos, tales como el núcleo, derivados de eucariontes o núcleos verdaderos. (1.3)

**Células madre embrionarias** (ES, *embryonic cells*). Tipo de célula que tiene poderes de diferenciación virtualmente ilimitados, que se encuentra en el blastocisto de los mamíferos, que es una etapa temprana del desarrollo embrionario comparable a la blástula de otros animales. (HP 1.6)

**Células madre hematopoyéticas** (HSC, *hematopoietic stem cells*). Células que se encuentran principalmente en la médula ósea y que son capaces tanto de autorrenovarse, como de dar lugar a todos los tipos de células sanguíneas. (HP 1.6)

**Células madre.** Células situadas en diversos tejidos del cuerpo que constituyen una población de reserva capaz de dar lugar a las diversas células de ese tejido. Las células madre se pueden definir como células indiferenciadas que son capaces de 1) autorrenovación, es decir, producción de células como ellas mismas, y 2) diferenciación en dos o más tipos de células maduras. (HP 1.6)

**Células procariotas.** Células estructuralmente simples, que incluyen arqueas y bacterias que no tienen orgánulos delimitados por membranas; derivado de *pro-karyon*, o "antes del núcleo". (1.3)

**Citosol.** Región de contenido líquido del citoplasma alrededor de los orgánulos membranosos de una célula eucariota. (1.3)

**Cromatina.** Complejo material de nucleoproteína que compone los cromosomas de las eucariotas. (1.3)

**Diferenciación.** Proceso a través del cual las células no especializadas se vuelven más complejas y especializadas en estructura y función. (1.5)

**Fijación de nitrógeno.** Proceso a través del cual el gas nitrógeno se reduce químicamente y se convierte en un componente de compuestos orgánicos. (1.4)

***In vitro*.** Fuera del cuerpo. De las células que crecen en cultivo se dice que han crecido *in vitro*; los estudios sobre células cultivadas son una herramienta esencial para los biólogos celulares y moleculares. (1.2)

**Metabolismo.** Total de las reacciones químicas que ocurren dentro de una célula. (1.2)

**Micrómetro.** Medida de longitud igual a $10^{-6}$ metros. (1.7)

**Microscopio.** Instrumento que proporciona una imagen ampliada de un objeto diminuto. (1.1)

**Nanómetro.** Medida de longitud igual a $10^{-9}$ metros. (1.7)

**Núcleo.** Orgánulo que contiene el material genético de una célula eucariota. (1.3)

**Nucleoide.** Región pobremente definida de una célula procariota que contiene su material genético. (1.3)

**Organismos modelo.** Organismos que se han utilizado ampliamente para la investigación, por lo que se conoce mucho sobre su biología. Estos organismos tienen propiedades que los han convertido en excelentes sujetos de investigación. Tales organismos incluyen la bacteria *E. coli*, la levadura en ciernes *S. cerevisiae*, el nematodo *C. elegans*, la mosca de la fruta *D. melanogaster*, la planta de mostaza *A. thaliana* y el ratón *M. musculus*. (1.5)

**Orgánulos.** Estructuras intracelulares diversas desde el punto de vista organizacional y funcional, membranosas o delimitadas por membranas, que son la característica definitoria de las células eucariotas. (1.3)

**Provirus.** Término para designar el DNA viral cuando se ha integrado en el DNA del (de los) cromosoma(s) de su célula hospedera. (1.8)

**Teoría celular.** Teoría de la organización biológica que tiene tres principios: todos los organismos están compuestos por una o más células; la célula es la unidad estructural de la vida; las células sólo surgen a partir de la división de células preexistentes. (1.1)

**Teoría del endosimbionte.** Propone, basada en evidencias considerables, que las mitocondrias y los cloroplastos surgieron de procariotas simbióticas que se establecieron dentro de una célula huésped primitiva. (EP 1.9)

**Último ancestro común eucariótico** (LECA, *Last Eukaryotic Common Ancester*). Especie que fue el ancestro común de todas las especies eucarióticas existentes; se cree que es un organismo unicelular que ya tenía todas las propiedades biológicas celulares características de las células eucariotas. (EP 1.9)

**Virión.** Forma que un virus asume fuera de una célula, que consiste en un núcleo de material genético rodeado por una cápsula de proteína o lipoproteína. (1.8)

**Viroides.** Pequeños patógenos intracelulares obligatorios que, a diferencia de los virus, consisten únicamente en un círculo no recubierto de material genético, RNA. (1.8)

**Virus.** Pequeños patógenos intracelulares obligatorios que no se consideran vivos, porque no pueden dividirse directamente, lo cual es un requerimiento, de acuerdo a la teoría celular de la vida. (1.8)

# Capítulo 2



**Aceites.** Grasas que son líquidas a temperatura ambiente. (2.7)

**Ácido.** Una molécula que es capaz de liberar un ion de hidrógeno. (2.4)

**Ácido desoxirribonucleico** (DNA). Un ácido nucleico bicatenario compuesto por dos cadenas poliméricas de nucleótidos que contienen desoxirribosa. (2.18)

**Ácido graso.** Cadena de hidrocarburos no ramificada larga con un solo grupo de ácido carboxílico en un extremo. (2.7)

**Ácido ribonucleico** (RNA). Un ácido nucleico monocatenario compuesto de una cadena polimérica de nucleótidos que contienen ribosa. (2.18)

**Ácidos grasos insaturados.** Aquellos que tienen uno o más enlaces dobles entre átomos de carbono. (2.7)

**Ácidos grasos saturados.** Aquellos que carecen de dobles enlaces entre los carbonos. (2.7)

**Almidón.** Mezcla de dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, que sirve como energía química disponible en la mayoría de las células vegetales. (2.6)

**Anfipático.** Una propiedad biológicamente importante de una molécula que tiene regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. (2.7, 4.2)

**Anión.** Un átomo ionizado o molécula con una carga neta negativa. (2.1)

**Átomo electronegativo.** El átomo con la mayor fuerza de atracción; el átomo que puede capturar la mayor parte de los electrones de un enlace covalente. (2.1)

**Autoensamblaje.** La propiedad de las proteínas (u otras estructuras) para asumir la correcta (nativa) conformación basada en el comportamiento químico dictado por la secuencia de aminoácido. (2.12)

**Base.** Cualquier molécula que sea capaz de aceptar un ion de hidrógeno. (2.4)

**Bioquímicos.** Compuestos sintetizados por organismos vivos. (2.5)

**Cadena beta (β).** Una posible estructura secundaria de un polipéptido, en la que el esqueleto de la cadena asume una conformación plegada (o plisada). (2.9)

**Cadena de polipéptido.** Un polímero no ramificado, largo y continuo formado por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos covalentes. (2.8)

**Cadena lateral o grupo R.** El grupo funcional definidor de un aminoácido, que puede variar desde un solo hidrógeno hasta unidades complejas polares o no polares en los 20 aminoácidos que se encuentran más comúnmente en las células. (2.8)

**Cambio conformacional.** Un movimiento predecible dentro de una molécula que está asociado con la actividad biológica. (2.10)

**Carbohidratos (glucanos).** Moléculas orgánicas que incluyen azúcares simples (monosacáridos) y polímeros multisacáridos, que en gran medida sirven como almacenamiento de energía y compuestos estructurales en las células. (2.6)

**Catión.** Un átomo ionizado o molécula con una carga positiva adicional. (2.1)

**Celulosa.** Polímero de glucosa no ramificada con enlaces β (1 → 4) que se ensambla en cables y sirve como elemento estructural principal de las paredes celulares de las plantas. (2.6)

**Complejo multiproteico.** La interacción de más de una proteína completa para formar un complejo funcional más grande. (2.11)

**Conformación.** La disposición tridimensional de los átomos dentro de una molécula, a menudo importante para comprender la actividad biológica de las proteínas y otras moléculas en una célula viva. (2.9)

**Cristalografía de rayos X (difracción de rayos X).** Técnica que bombardea los cristales de proteínas con un rayo delgado de rayos X de una sola longitud de onda (monocromática). La radiación que es difractada por los electrones de los átomos de proteína golpea una placa o sensor fotográfico. El patrón de difracción producido por el cristal está determinado por la estructura dentro de la proteína. (2.10, 18.14)

**Chaperones moleculares.** Diversas familias de proteínas cuyo papel es ayudar al plegamiento y ensamblaje de proteínas mediante la prevención de interacciones indeseables. (2.12, EP2.14)

**Desnaturalización.** Separación de la doble hélice de DNA en sus dos cadenas componentes. (2.12, 10.8)

**Dominio.** Una región dentro de una proteína (o RNA) que se pliega y funciona de manera semiindependiente. (2.10)

**Enhebrado.** Método basado en computadora para adivinar la estructura tridimensional de una proteína alineando una secuencia de aminoácidos en la estructura tridimensional de una proteína relacionada cuya estructura ya se conoce. (2.12)

**Enlace covalente.** El tipo de enlace químico en el que los pares de electrones se comparten entre dos átomos. (2.1)

**Enlace de amida.** El enlace químico que se forma entre los ácidos carboxílicos y aminas (o grupos funcionales ácidos y amino) mientras se produce una molécula de agua. (2.5)

**Enlace de hidrógeno.** La interacción débil y atractiva entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo electronegativo (por tanto, con una carga positiva parcial) y un segundo átomo electronegativo. (2.3)

**Enlace éster.** El enlace químico que se forma entre los ácidos carboxílicos y los alcoholes (o grupos funcionales ácidos y alcohólicos) mientras se produce una molécula de agua. (2.5)

**Enlace glucosídico.** El enlace químico que se forma entre las moléculas de azúcar. (2.6)

**Enlace iónico.** Enlace no covalente que ocurre entre iones de carga opuesta, también llamado puente de sal. (2.3)

**Enlace no covalente.** Enlace químico relativamente débil basado en fuerzas atractivas entre regiones con carga opuesta dentro de una molécula o entre dos moléculas cercanas. (2.3)

**Enlace peptídico.** Enlace químico que une los aminoácidos en una proteína, que se forma cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de un segundo aminoácido. (2.8)

**Especificidad.** La propiedad de la interacción selectiva entre los componentes de una célula que es básica para la vida. (2.8)

**Estructura cuaternaria.** La organización tridimensional de una proteína que consta de más de una cadena polipeptídica o subunidad. (2.11)

**Familias.** Agrupaciones de proteínas que han surgido de un único gen ancestral que sufrió una serie de duplicaciones y modificaciones posteriores durante el curso de la evolución. (2.17)

**Fuerza de Van der Waals.** Una fuerza de atracción débil debido a asimetrías transitorias de carga dentro de átomos o moléculas adyacentes. (2.3)

**Glucosaminoglucanos** (GAG). Un grupo de polisacáridos altamente ácidos con la estructura de —A—B—A—B—, donde A y B representan dos azúcares diferentes. (2.6)

**Glucógeno.** Polímero de glucosa altamente ramificado que sirve como energía química fácilmente disponible en la mayoría de las células animales. (2.6)

**Grasas.** Moléculas que consisten en una cadena principal de glicerol unida por enlaces éster a tres ácidos grasos, también denominados triacilgliceroles. (2.7)

**Grupos funcionales.** Grupos particulares de átomos que tienden a actuar como una

unidad, que a menudo afectan el comportamiento químico y físico de las moléculas orgánicas más grandes a las que pertenecen. (2.5)

**Hélice alfa (α)**. Una posible estructura secundaria de polipéptidos, en la que el esqueleto principal de la cadena forma una conformación en espiral (es decir, helicoidal). (2.9)

**Hidrofílico.** La tendencia de las moléculas polares a interactuar con las moléculas de agua circundantes, que también son polares; derivado de "amar el agua". (2.3)

**Hoja beta (β).** Una posible estructura secundaria de un polipéptido, en el que varias cadenas β están paralelas entre sí, creando la conformación de una lámina. (2.9)

**Interacción hidrofóbica.** La tendencia de las moléculas no polares a agregarse para minimizar su interacción colectiva con las moléculas de agua polares circundantes; derivado del "temor al agua". (2.3)

**Intermediario metabólico.** Un compuesto producido durante un paso de una vía metabólica. (2.5)

**Ion.** Un átomo o molécula con una carga neta positiva o negativa porque ha perdido o ganado uno o más electrones durante una reacción química. (2.1)

**Isoformas.** Diferentes versiones de una proteína. Las isoformas pueden estar codificadas por genes separados estrechamente relacionados, o formadas como variantes de empalme por corte y empalme alternativo a partir de un único gen. (2.17)

**Macromoléculas.** Grandes moléculas altamente organizadas, cruciales para la estructura y función de las células; dividido en polisacáridos, ciertos lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (2.5)

**Modificaciones postraduccionales** (PTM). Alteraciones en las cadenas laterales de los 20 aminoácidos básicos después de su incorporación a una cadena polipeptídica. (2.8)

**Moléculas no polares.** Moléculas cuyos enlaces covalentes tienen una distribución de carga casi simétrica porque los átomos componentes tienen aproximadamente las mismas electronegatividades. (2.1)

**Moléculas polares.** Moléculas con una distribución desigual de carga debido a que los átomos componentes de varios enlaces tienen electronegatividades muy diferentes. (2.1)

**Mutagénesis dirigida al sitio.** Una técnica de investigación para modificar un gen de una manera predeterminada a fin de producir una proteína con una secuencia de aminoácidos específicamente alterada. (2.16, 18.23)

**Nativo.** La estructura tridimensional natural de una proteína u otra macromolécula cuando está dentro de una célula viva. (2.12)

**Nucleótidos.** Los bloques moleculares de DNA y RNA. (2.18)

**Oligosacáridos.** Cadenas pequeñas compuestas de azúcares covalentemente unidos a lípidos y a proteínas; distinguen un tipo de célula de otro y ayudan a mediar las interacciones de una célula con su entorno. (2.6)

**pH.** La medida estándar de acidez relativa, en matemáticas es igual a $-\log [H^+]$. (2.4)

**Pirimidina.** Una clase de base nitrogenada que se encuentra en los nucleótidos que tiene una estructura de anillo único, que incluye citosina y timina, que se encuentran en el DNA, y citosina y uracilo, que se encuentran en el RNA. (2.18, 10.5)

**Polisacárido.** Un polímero de unidades de azúcar unidas por enlaces glucosídicos. (2.6)

**Proteína fibrosa.** Una con una estructura terciaria que es muy alargada, se asemeja a una fibra. (2.10)

**Proteína globular.** Una con una estructura terciaria que es compacta, se asemeja a un globo. (2.10)

**Proteoma.** El inventario completo de proteínas en un organismo particular, tipo de célula u organelo. (2.15)

**Proteómica.** Campo de expansión de la bioquímica de proteínas que realiza estudios a gran escala sobre diversas mezclas de proteínas. (2.15)

**Puente de disulfuro.** Se forma entre dos cisteínas que están distantes entre sí en la cadena principal del polipéptido o en dos polipéptidos separados. Ayudan a estabilizar las formas intrincadas de las proteínas. (2.8)

**Purina.** Una clase de base nitrogenada que se encuentra en los nucleótidos que tiene una estructura de doble anillo, que incluye adenina y guanina, que se encuentran tanto en el DNA como en el RNA. (2.18, 10.5)

**Radicales libres.** Átomo o molécula altamente reactiva que contiene un único electrón desapareado. (HP 2.2)

**Respuesta al choque térmico.** Activación de la expresión de una diversidad de genes en respuesta a la elevación de la temperatura. Los productos de estos genes, incluidas las chaperonas moleculares, ayudan al organismo a recuperarse de los efectos dañinos de la temperatura elevada. (EP2.14)

**Ribozima.** Una molécula de RNA que funciona como un catalizador en las reacciones celulares. (2.18)

**Subunidad.** Una cadena polipeptídica que se asocia con otras cadenas (subunidades) para formar un complejo completo de proteína o complejo de proteína. (2.11)

**Tampones.** Compuestos que pueden interactuar con hidrógeno libre o iones hidroxilo, minimizando un cambio en el pH. (2.4)

**Triacilgliceroles.** Polímeros que consisten en una cadena principal de glicerol unida por enlaces éster a tres ácidos grasos, comúnmente llamados grasas. (2.7)

**Trifosfato de adenosina** (ATP). Nucleótido que consiste en adenosina unida a tres grupos fosfato; es la principal fuente de energía inmediata para las células procariotas y eucariotas. (2.18)

**Trifosfato de guanosina** (GTP). Un nucleótido de gran importancia en actividades celulares. Se une a una variedad de proteínas (llamadas proteínas G) y actúa como un interruptor para accionar sus actividades. (2.18)

**Vía metabólica.** Una serie de reacciones químicas que dan como resultado la síntesis de un producto final importante para la función celular. (2.5)

## Capítulo 3



**Agente oxidante.** Sustancia que se reduce en una reacción redox y provoca la oxidación de otra sustancia. (3.9)

**Agente reductor.** Sustancia que se oxida en una reacción redox, y hace que otra sustancia se reduzca. (3.9)

**Ajuste inducido.** El cambio conformacional en una enzima después de que el sustrato se ha unido y permite que la reacción química continúe. (3.6)

**Bioenergética.** El estudio de los diversos tipos de transformaciones de energía que ocurren en los organismos vivos. (3.1)

**Cambio de energía libre** ($\Delta G$). El cambio durante un proceso de la cantidad de energía disponible para hacer el trabajo. (3.2)

**Cambio de energía libre estándar ($\Delta G°'$).** Cambio de energía libre cuando un mol de cada reaccionante se convierte en un mol de cada producto en condiciones definidas estándar: temperatura 298 K y presión de 1 atm. (3.2)

**Ciclo del ácido tricarboxílico** (ciclo TCA). Ruta metabólica circular que oxida la acetil CoA y conserva su energía; el ciclo también se conoce como ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. (3.9)

**Cinética.** El estudio de la velocidad de las reacciones químicas. (3.7)

**Coenzima.** Componente orgánico no proteico de una enzima. (3.5)

**Cofactor.** El componente no proteico de una enzima, puede ser inorgánico u orgánico. (3.5)

**Complejo enzima-sustrato** (ES). La asociación física entre una enzima y su(s) sustrato(s), durante la cual tiene lugar la catálisis de la reacción. (3.5)

**Constante de disociación.** Medida de la fuerza de unión entre dos moléculas. (3.2)

**Constante de equilibrio de una reacción** ($K_{eq}$). Proporción entre la concentración de los productos y la concentración de los reaccionantes cuando una reacción está en equilibrio. (3.2)

**Constante de Michaelis ($K$M).** En la cinética de enzimas, el valor igual a la concentración de sustrato presente cuando la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. (3.7)

**Deshidrogenasa.** Enzima que cataliza una reacción redox mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un reactivo. (3.10)

**Energía.** Capacidad de hacer trabajo; existe en dos formas: potencial y cinética. (3.1)

**Energía de activación.** Energía cinética mínima necesaria para que un reaccionante experimente una reacción química. (3.5)

**Entropía (S).** Medida del desorden relativo del sistema o el universo, asociada con los movimientos aleatorios de la materia; como todos los movimientos cesan en el cero absoluto (0 K), la entropía es cero sólo a esa temperatura. (3.1)

**Enzimas.** Catalizadores proteicos de vital importancia de las reacciones celulares. (3.5)

**Estado de transición.** El punto durante una reacción química donde los enlaces se rompen y se reforman para generar productos. (3.5)

**Estado estacionario.** Condición metabólica en la que las concentraciones de reactivos y productos son esencialmente constantes, aunque las reacciones individuales pueden no estar en equilibrio. (3.4)

**Fermentación.** Vía metabólica anaeróbica en la que el piruvato se convierte en otra molécula (a menudo lactato o etanol, según el organismo) y se regenera $NAD^+$ el cual es usado en la glucólisis. (3.10)

**Fosforilación a nivel de sustrato.** Síntesis directa de ATP mediante la transferencia de un grupo fosfato de un sustrato al ADP. (3.10)

**Glucólisis.** La primera vía en el catabolismo de la glucosa, no requiere oxígeno y da como resultado la formación de piruvato. (3.9)

**Gluconeogénesis.** Proceso mediante el cual se sintetiza glucosa a partir de piruvato. (3.13)

**Inhibición de retroalimentación.** Mecanismo para controlar las vías metabólicas donde el producto final interactúa con una enzima de la ruta, lo que da como resultado la inactivación de la enzima y consecuentemente de la ruta. (3.12)

**Inhibidor competitivo.** Un inhibidor enzimático que compite con las moléculas del sustrato para acceder al sitio activo. (3.7)

**Inhibidor de enzimas.** Cualquier molécula que pueda unirse a una enzima y disminuir su actividad, clasificada como no competitiva o competitiva en función de la naturaleza de la interacción con la enzima. (3.7)

**Inhibidor irreversible.** Un inhibidor enzimático que se une fuertemente, a menudo de forma covalente, e inactiva la molécula de la enzima de forma permanente. (3.7)

**Inhibidor no competitivo.** Un inhibidor enzimático que no se une al mismo sitio que el sustrato, por lo que el nivel de inhibición sólo depende de la concentración del inhibidor. (3.7)

**Intermediario metabólico**. Compuesto producido en uno de los pasos de una vía metabólica. (3.9)

**Metabolismo.** Total de las reacciones químicas que ocurren dentro de una célula. (3.9)

**Modulación alostérica.** Modificación de la actividad de una enzima a través de la interacción con un compuesto que se une a un sitio (es decir, sitio alostérico) distinto del sitio activo. (3.12)

**Número de recambio.** El número máximo de moléculas de sustrato que pueden convertirse en productos por una molécula de enzima en la unidad de tiempo. (3.7)

**Poder reductor.** Potencial de una célula para reducir los intermedios metabólicos en productos, por lo general medidos a través del tamaño del conjunto NADPH. (3.11)

**Potencial de transferencia.** Medida de la capacidad de una molécula para transferir cualquier grupo a otra molécula, con las moléculas que tienen una mayor afinidad para el grupo como las mejores receptoras, y las que tienen una menor afinidad como las mejores donantes. (3.10)

**Primera ley de la termodinámica.** La energía no se puede crear ni destruir. También conocida como principio de conservación de la energía. (3.1)

**Proteína cinasa.** Enzima que transfiere grupos de fosfato a otras proteínas, a menudo tiene el efecto de regular la actividad de esas otras proteínas. (3.12)

**Reacción de oxidación-reducción (redox).** Reacción en la que se produce un cambio en el estado electrónico de los reactivos. (3.9)

**Reacciones endergónicas.** Reacciones que son termodinámicamente desfavorables, y no pueden ocurrir espontáneamente al poseer un valor de $+\Delta G$. (3.2)

**Reacciones endotérmicas.** Aquellas que absorben calor en condiciones de presión y temperatura constantes. (3.1)

**Reacciones espontáneas.** Reacciones termodinámicamente favorables, capaces de ocurrir sin ningún aporte de energía externa. (3.1)

**Reacciones exergónicas.** Reacciones termodinámicamente favorables, con un valor $-\Delta G$. (3.2)

**Reacciones exotérmicas.** Aquellas que liberan calor en condiciones de presión y temperatura constantes. (3.1)

**Segunda ley de la termodinámica.** Medida de la fuerza de unión entre dos moléculas. (3.1)

**Sitio activo.** Porción de una molécula de enzima que participa directamente en la unión del sustrato. (3.5)

**Sitio alostérico.** Región de una proteína que causa que la proteína cambie su conformación cuando se une a otra molécula. (3.12)

**Sustrato.** El reaccionante enlazado por una enzima. (3.5)

**Termodinámica.** Estudio de los cambios en la energía que acompañan a los eventos en el universo físico. (3.1)

**Transducción.** Incorporación de un gen en un genoma celular por medio de un virus. (3.1)

**Velocidad máxima ($V_{máx}$).** La mayor rapidez que se logra para una determinada reacción catalizada por enzimas; ocurre cuando la enzima está saturada con sustrato. (3.7)

**Vía anabólica.** Vía metabólica que da como resultado la síntesis de productos relativamente complejos. (3.9)

**Vía anaeróbica.** Vía enzimática para generar ATP a partir de glucosa sin necesidad de oxígeno. (3.10)

**Vía catabólica.** Vía metabólica en la que moléculas relativamente complejas se descomponen en productos más simples. (3.9)

**Vía metabólica.** Secuencia de reacciones químicas que dan como resultado la síntesis de un producto final importante para la función celular. (3.9)

## Capítulo 4



**Anfipático.** La propiedad biológicamente importante de una molécula que tiene ambas regiones, hidrofóbicas e hidrofílicas. (4.2)

**Antiporte.** Un modo de transporte de membrana en el cual una especie transportada se mueve a través de la membrana en una dirección, acoplada con el movimiento de diferentes especies a través de la membrana en dirección contraria (4.14)

**Axón.** Una sola extensión prominente que surge del cuerpo de la célula y conduce impulsos salientes lejos del cuerpo de la célula hacia la(s) célula(s) blanco. (4.16)

**Balsas de lípidos.** Microdominios dentro de una membrana celular que poseen fluidez disminuida debido a la presencia de colesterol, glucolípidos y fosfolípidos que contienen ácidos grasos más largos y saturados. Una residencia propuesta de proteínas de señalización y ancladas a GPI. (4.6)

**Bicapa lipídica.** Fosfolípidos autoensamblados en una estructura bimolecular basada en interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas; de importancia biológica como centro de organización de las membranas celulares. (4.1)

**Canal activado por ligando.** Un canal de membrana que se abre o se cierra en respuesta a la unión de una molécula en su superficie. (4.11)

**Canal activado por voltaje.** Canal iónico que se abre o se cierra en respuesta a cambios del voltaje a través de una membrana. (4.11)

**Canal de compuerta mecánica.** Un canal de membrana que se abre o se cierra en respuesta a fuerzas mecánicas, como la tensión en la membrana. (4.11)

**Canal de compuerta.** Un canal iónico que puede cambiar la conformación entre una forma abierta para su ion soluto y una cerrada al ion; tales canales pueden ser de compuerta de voltaje, de compuerta química o de compuerta mecánica, según la naturaleza del proceso que estimula el cambio de conformación. (4.11)

**Canal iónico.** Una estructura transmembrana (p. ej., una proteína integral con un poro acuoso) permeable a un ion o iones específicos. (4.11)

**Célula postsináptica.** Célula que recibe neurotransmisores desde otra célula a través de una sinapsis. (4.18)

**Célula presináptica.** Una célula que envía neurotransmisores a otra célula a través de una sinapsis. (4.18)

**Coeficiente de partición.** El cociente de la solubilidad de un soluto en aceite en relación con la solubilidad en agua; es una medida de la polaridad relativa de una sustancia biológica. (4.10)

**Colesterol.** Esterol hallado en células animales que puede constituir hasta la mitad del lípido en una membrana plasmática, con una proporción relativa en cualquier membrana que afecta su comportamiento fluido. (4.2)

**Conducción saltatoria.** Propagación de un impulso nervioso cuando un potencial de acción estimula a otro en el tramo adyacente de la membrana desenvuelta (es decir, se propaga al causar que los potenciales de acción salten desde un nodo de Ranvier al siguiente). (4.17)

**Conductancia.** El movimiento de pequeños iones a través de membranas. (4.11)

**Cotransporte.** Un proceso que acopla el movimiento de dos solutos a través de una membrana, llamado simporte si dos solutos se mueven en la misma dirección y antiporte si se mueven en sentido contrario. (4.14)

**Dendritas.** Extensiones finas de los cuerpos celulares de la mayor parte de las neuronas; las dendritas reciben la información de entrada de fuentes externas, por lo general otras neuronas. (4.16)

**Despolarización.** Una disminución de la diferencia potencial eléctrica a través de una membrana. (4.16)

**Difusión facilitada.** Proceso por el cual el cociente de difusión de una sustancia aumenta por la interacción con una proteína de membrana específica de una sustancia. (4.13)

**Difusión.** Proceso espontáneo en el cual una sustancia se mueve de un área de mayor concentración a otra de menor concentración, alcanzándose finalmente la misma concentración en todas las áreas. (4.9)

**Dominio poro.** Parte de un canal iónico de compuerta de voltaje que forma un canal conductor de ion a través de la membrana. (4.11)

**Dominio sensor de voltaje.** La parte de un canal iónico de compuerta de voltaje que le permite responder al voltaje de membrana. (4.11)

**Dominio transmembrana.** Parte de una proteína de membrana que pasa a través de la bicapa lipídica, compuesta a menudo de aminoácidos no polares en una conformación α-helicoidal. (4.5)

**Esfingolípidos.** Una clase de lípidos de membrana —derivados de la esfingosina— consistente en una esfingosina unida a un ácido graso por su grupo amino. (4.2)

**Fosfoglicéridos.** Nombre dado a los fosfolípidos de membrana que se construyen sobre la columna vertebral de glicerol. (4.2)

**Fosfolípidos.** Lípidos que contienen fosfato y representan los componentes primarios de la bicapa lipídica de las membranas celulares. Los fosfolípidos incluyen tanto los fosfoglicéridos como la esfingomielina. (4.2)

**Fusión celular.** Técnica mediante la cual dos tipos diferentes de células (de un organismo o de especies diferentes) se unen para producir una célula con una membrana plasmática continua. (4.7)

**Gas nervioso.** Un arma química que envenena el sistema nervioso. (4.0)

**Glucolípidos.** Moléculas de lípido basadas en esfingosinas ligadas a carbohidratos, a menudo componentes activos de las membranas plasmáticas. (4.2)

**Glucosilación.** Las reacciones por las cuales grupos de azúcares son añadidos a lípidos y proteínas. (4.3)

**Gradiente electroquímico.** La diferencia total de carga eléctrica y concentración de soluto que determina la habilidad de un electrólito para difundirse entre dos compartimientos. (4.9)

**Grupo cabeza.** Región polar e hidrosoluble de un fosfolípido, que consiste en un grupo de fosfato ligado a una o varias moléculas pequeñas e hidrofílicas. (4.2)

**Hendidura sináptica.** Estrecho espacio entre dos células excitables. Una *célula presináptica* conduce impulsos hacia la sinapsis; una *célula postsináptica* siempre se encuentra en el lado receptor de una sinapsis. (4.18)

**Hipertónico (o hiperosmótico).** Propiedad de un compartimiento que tiene una concentración de soluto más alta en comparación con otra en un compartimiento dado. (4.10)

**Hipotónico (o hiposmótico).** Propiedad de un compartimiento que tiene una concentración de soluto inferior en comparación con otra en un compartimiento dado. (4.10)

**Impulso nervioso.** Proceso a través del cual un potencial de acción se propaga a lo largo de la membrana de una neurona mediante la estimulación secuencial de potenciales de acción en tramos adyacentes de la membrana. (4.17)

**Isotónico o isosmótico.** Propiedad de un compartimiento que tiene la misma

concentración de soluto en comparación con otro compartimiento. (4.10)

**Ligando.** Cualquier molécula que puede enlazarse a un receptor a causa de su estructura complementaria. (4.1)

**Liposoma.** Bicapa lipídica artificial que se autoensambla en una vesícula o vesículas esféricas en un ambiente acuoso. (4.2)

**Membrana plasmática.** Membrana que sirve de límite entre el interior de una célula y su ambiente extracelular. (4.1)

**Neurotransmisor.** Sustancia química liberada de una terminal presináptica que se enlaza a la célula blanco postsináptica y cambia el potencial de membrana de la célula objetivo. (4.18)

**Oligosacáridos.** Pequeñas cadenas formadas de los azúcares enlazados a lípidos y proteínas en forma covalente; ellos distinguen un tipo de célula de otra, y ayudan a mediar las interacciones de una célula con sus alrededores. (4.3)

**Ósmosis.** Propiedad del agua de pasar a través de una membrana semipermeable de una región de más baja concentración de soluto a otra de mayor concentración de soluto, con la tendencia de igualar finalmente la concentración de soluto en los dos compartimientos. (4.10)

**Plasmólisis.** Contracción que ocurre cuando se coloca una célula vegetal en un medio hipertónico; su volumen se reduce ya que la membrana plasmática se separa de la pared celular circundante. (4.10)

**Potencial de acción.** Los cambios colectivos en el potencial de la membrana, que comienzan con la despolarización al umbral y terminan con la vuelta al potencial de reposo, ocurren con el estímulo de una célula excitable y actúan como la base para la comunicación neuronal. (4.16)

**Potencial de membrana.** Diferencia de potencial eléctrico a través de una membrana. (4.16)

**Potencial de reposo.** Diferencia potencial eléctrica medida en una célula excitable cuando no está sujeta a estímulo externo. (4.16)

**Proteína anclada a lípido.** Una proteína asociada a la membrana localizada fuera de la bicapa, pero enlazada en forma covalente a una molécula de lípido dentro de la bicapa. (4.4)

**Proteína de transmembrana.** Una proteína que es insertada en la membrana y la cubre a través de todo su ancho. (4.4)

**Proteína integral.** Una proteína asociada a la membrana que penetra o atraviesa la bicapa lipídica. (4.4)

**Proteínas ancladas a GPI.** Proteínas periféricas de membrana que están ancladas a la membrana mediante el enlace a una molécula de glicosilfosfatidilinositol de la bicapa. (4.4)

**Proteínas periféricas.** Proteína asociada a la membrana localizada completamente fuera de la bicapa lipídica y que interacciona con ella mediante enlaces no covalentes. (4.4)

**Receptor.** Cualquier sustancia que se pueda enlazar a una molécula específica (ligando), que conduce a menudo a una absorción o a una transducción de señal. (4.1)

**Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo** (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*). Técnica para estudiar el movimiento de los componentes de la membrana compuesta de tres pasos: 1) liga de los componentes celulares a un tinte fluorescente, 2) blanqueo irreversible de una parte de la célula (quitando la fluorescencia visible de), 3) monitoreo de la reaparición de la fluorescencia en la parte blanqueada de la célula (debido al movimiento aleatorio de los componentes teñidos desde fuera del área blanqueada). (4.7)

**Réplica de criofractura.** Técnica en la que una muestra de tejido se congela primero y luego se golpea con una cuchilla que fractura el bloque de tejido a lo largo de las líneas de resistencia mínima, lo cual provoca a menudo una línea de fractura entre las dos hojuelas de la bicapa lipídica; luego se depositan metales en las superficies expuestas para crear una réplica sombreada, que se analiza por microscopia electrónica. (4.4)

**Saturación.** Condición en la cual cada molécula de una enzima o transportador está enlazada a su molécula substrato, de modo que la adición de más substrato no tiene efecto adicional en la velocidad de transporte o de reacción. (4.13)

**Seguimiento de partículas individuales** (SPT, *single-particle tracking*). Técnica para estudiar el movimiento de proteínas de membrana que consiste en dos pasos: 1) unión de las moléculas de proteína a sustancias visibles, tales como partículas de oro coloidal y 2) monitoreo de los movimientos de las partículas individuales marcadas bajo el microscopio. (4.7)

**Semipermeable.** Propiedad de la membrana de ser libremente permeable al agua, mientras que permite un paso mucho más lento a iones pequeños y solutos polares. (4.10)

**Sinapsis.** La unión especializada de una neurona con su célula objetivo. (4.18)

**Temperatura de transición.** Temperatura a la cual una membrana se convierte de un estado fluido a gel cristalino donde el movimiento lípidomolecular se reduce en gran medida. (4.6)

**Transducción de señal.** Proceso total en el cual la información llevada por moléculas mensajeras extracelulares se traduce en cambios que ocurren dentro de la célula. (4.1)

**Transportador facilitador.** Una proteína transmembrana que enlaza una sustancia específica y, así, cambia la conformación para facilitar la difusión de la sustancia hacia abajo del gradiente de concentración. (4.13)

**Transporte activo.** Proceso energodependiente donde una sustancia se enlaza a una proteína transmembrana específica y cambia su conformación para permitir el paso de la sustancia por la membrana, en contra del gradiente electroquímico para esa sustancia. (4.14)

**Umbral.** El punto durante la despolarización de una célula excitable donde los canales del sodio de compuerta de voltaje se abren, con la afluencia del $Na^+$ resultante que causa una breve inversión en el potencial de membrana. (4.16)

**Unión neuromuscular.** Punto de contacto de la terminal de un axón con una fibra muscular; la unión neuromuscular es sitio de transmisión de impulsos nerviosos del axón a la fibra de músculo, a través de la fisura sináptica. (4.18)

**Vaina de mielina.** Material rico en lípidos envuelto alrededor de la mayor parte de las neuronas en el cuerpo vertebrado. (4.16)

**Vesículas sinápticas.** Los sitios de almacenamiento para neurotransmisores dentro de los botones terminales de un axón neuronal. (4.18)

# Capítulo 5



**Aerobios.** Organismos que dependen del oxígeno para metabolizar compuestos ricos en energía. (5.1)

**Anaerobios.** Organismos que utilizan compuestos ricos en energía a través de vías metabólicas independientes del oxígeno, tales como la glucólisis y la fermentación. (5.1)

**Átomos de cobre de la cadena transportadora de electrones.** Un tipo de transportador de electrones; estos átomos se localizan dentro de un complejo de proteína simple de la membrana mitocondrial interna, que acepta y dona un electrón simple como aquellos alternativos entre los estados $Cu^{2+}$ y Cu1+. (5.4)

**ATP sintasa.** La enzima ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna, cuya cabeza es $F_1$ y su pieza base $F_0$ está integrada a su propia membrana. (5.7)

**Cadena respiratoria o transportadora de electrones.** Los transportadores de electrones incorporados a la membrana que aceptan electrones de alta energía y secuencialmente disminuyen el estado energético de los electrones, mientras ellos pasan a través de la cadena, con el resultado neto de la captura de energía para el uso en la síntesis de ATP u otras moléculas que almacenan energía. (5.4)

**Ciclo de Krebs**. Un nombre alternativo para el ciclo del TCA. (5.2)

**Ciclo del ácido cítrico.** Un nombre alternativo para el ciclo del TCA. (5.2)

**Ciclo del ácido tricarboxílico** (TCA). La vía cíclica metabólica que oxida la acetil CoA, conservando su energía; este ciclo también es conocido como ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. (5.2)

**Citocromo oxidasa.** Complejo de enzima que cataliza el paso final del transporte de electrones por la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno, de ese modo se consume oxígeno y se produce agua. (5.5)

**Citocromos.** Un tipo de transportador de electrones que consiste en una proteína unida a un grupo hem. (5.4)

**Cresta.** Los numerosos pliegues profundos, característicos de la membrana mitocondrial interna, que contiene la maquinaria molecular de la fosforilación oxidativa. (5.1)

**Espacio intermembranoso.** El espacio entre las membranas mitocondriales inteRNA y externas. (5.1)

**Flavoproteínas.** Un tipo de transportador de electrones en que un polipéptido se une a uno o dos grupos prostéticos relacionados, incluso FAD o FMN. (5.4)

**Fosforilación oxidativa.** La formación de ATP es impulsada por la energía derivada de los electrones de alta energía eliminados durante la oxidación de los sustratos en vías tales como el ciclo del TCA, con la energía liberada por la formación de ATP debido al paso por la cadena transportadora de los electrones en las mitocondrias. (5.4)

**Fuerza protón motriz** (Δp). Un gradiente electroquímico que se forma a través de las membranas de transducción de energía (la membrana mitocondrial interna, la membrana tilacoide, membrana plasmática bacteriana) siguiendo con la translocación de los protones durante el transporte de electrones. La energía del gradiente, que incluye tanto al gradiente de pH como al voltaje y se mide en voltios, se utiliza en la formación de ATP. (5.6)

**Glioxisoma.** Organelo que se encuentra en las células de las plantas que sirven como sitios para las reacciones enzimáticas que incluyen la conversión de ácidos grasos almacenados en carbohidratos. (5.10)

**Matriz.** Uno de los compartimientos acuosos de una mitocondria; la matriz se localiza dentro del interior de los organelos; el segundo compartimiento se denomina espacio *intermembranoso* y se ubica entre la membrana mitocondrial interna y externa. (5.1)

**Mecanismo quimiosmótico.** Mecanismo para la síntesis de ATP mediante el cual el movimiento de electrones a través de la cadena transportadora de electrones resulta en el establecimiento de un gradiente de protón que cruza la membrana bacteriana, tilacoide, la mitocondrial interna, con el gradiente que actúa como intermediario de alta energía, uniendo la oxidación de los sustratos con la fosforilación de ADP. (5.2)

**Mitocondria.** Organelo celular en el que la transducción de energía aeróbica toma lugar, se oxidan los intermediarios metabólicos tales como el piruvato para producir ATP. (5.1)

**Peroxisomas.** Organelos simples del citoplasma, multifuncionales, unidos a membrana, que llevan a cabo reacciones metabólicas, incluyendo la oxidación del sustrato, lo que conduce a la formación de peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, los peroxisomas son los sitios de oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga, la oxidación del ácido úrico, y la síntesis de los plasmalógenos. Los glioxisomas de las plantas, que llevan a cabo el ciclo del glioxilato, son un tipo de peroxisoma. (5.10)

**ΔpH.** Diferencia en el pH entre dos sitios de una membrana. En el contexto de este capítulo, el delta pH se refiere a la diferencia de pH que cruza la membrana mitocondrial interna. (5.6)

**Potencial de oxidación-reducción (redox).** La separación de carga, medición en voltaje, para cualquier par dado de agentes de oxidación-reducción, tales como $NAD^+$ y NADH, relativo al par estándar (p. ej., $H^+$ y $H_2$) (5.4)

**Potencial de transferencia de electrones.** La afinidad relativa por los electrones, por la que un compuesto con afinidad baja tiene un alto potencial para transferir uno o más electrones en una reacción redox (y así actúa como un agente reductor). (5.4)

**Proteínas hierro-sulfuro.** Un grupo de proteínas transportadoras de electrones con un centro inorgánico de hierro-sulfuro. (5.4)

**Ubiquinona**. Un componente de la cadena transportadora de electrones, la ubiquinona es una molécula liposoluble que contiene una cadena hidrofóbica larga compuesta por cinco unidades de carbonos isoprenoides. (5.4)

## Capítulo 6

**Aceptor primario de electrones.** Molécula que recibe el electrón fotoexcitado de los pigmentos del centro de reacción en ambos fotosistemas. (6.5)

**Antena.** Las moléculas de recolección de luz de una unidad fotosintética que absorbe fotones de longitudes de onda variables y transfiere la energía a las moléculas de pigmento en el centro de reacción. (6.5)

**Autótrofo.** Organismo capaz de sobrevivir con el $CO_2$ como su principal fuente de carbono. (6.1)

**Ciclo de Calvin (o ciclo de Calvin-Benson).** Vía para la conversión de $CO_2$ en carbohidratos; el ciclo ocurre en cianobacterias y en todas las células fotosintéticas eucarióticas. (6.9)

**Clorofila del centro de reacción.** La única molécula de clorofila, de los varios cientos existentes en la unidad fotosintética, que en realidad transfiere electrones a un aceptor de electrones. (6.5)

**Clorofila.** Es el más importante pigmento fotosintético absorbente de luz. (6.4)

**Cloroplasto.** Organelo citoplásmico especializado ligado a la membrana que es el sitio principal de la fotosíntesis en células eucariotas. (6.1)

**Complejo de recolección de luz II** (LHCII, *light-harvesting complex II*). Complejo de proteína de pigmento, ubicado fuera del fotosistema en sí, que contiene la mayoría de los pigmentos de antena que recogen la luz para el PSII. También se puede asociar con el PSI. (6.6)

**Espectro de absorción.** Un gráfico de la intensidad de la luz absorbida en relación con su longitud de onda. (6.4)

**Espectro de acción.** Un gráfico de la tasa relativa (o eficiencia) de un proceso producido por luz de varias longitudes de onda. (6.4)

**Estado de excitación.** Configuración de un electrón de una molécula después de que ha absorbido un fotón y esto ha activado al electrón para pasar de un orbital interno a uno externo. (6.4)

**Estado basal.** Estado no excitado de un átomo o molécula. (6.4)

**Estroma.** Espacio fuera del tilacoide pero dentro de la membrana interna relativamente impermeable de la envoltura del cloroplasto. (6.2)

**Fotoautótrofo.** Autótrofo que utiliza la energía radiante del sol para convertir el $CO_2$ en compuestos orgánicos. (6.1)

**Fotofosforilación cíclica.** Es la formación de ATP en los cloroplastos que se lleva a cabo por el PSI de forma independiente con respecto a PSII. (6.8)

**Fotofosforilación no cíclica.** la formación de ATP durante el proceso de fotosíntesis liberadora de oxígeno en la que los electrones se mueven en una trayectoria lineal desde $H_2O$ hasta $NADP^+$. (6.8)

**Fotólisis.** División del agua durante la fotosíntesis. (6.6)

**Fotón.** Cuerpo de energía luminosa. Cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor será la energía de los fotones. (6.4)

**Fotorrespiración.** Una serie de reacciones en las que el $O_2$ se une a RuBP, y finalmente resulta en la liberación desde la planta de $CO_2$ recientemente fijado. (6.9)

**Fotosíntesis.** Vía que convierte la energía de la luz solar en energía química utilizable por los organismos vivos. (6.1)

**Fotosistema I** (PSI, *photosystem I*). uno de los dos complejos de pigmentos separados espacialmente que son necesarios para aumentar la energía de un par de electrones lo suficiente como para eliminarlos de una molécula de agua y transferirlos a $NADP^+$. El fotosistema I eleva los electrones desde un nivel de energía aproximadamente en el punto intermedio hasta un nivel de energía superior a $NADP^+$. (6.5)

**Fotosistema II** (PSII, *photosystem II*). uno de los dos complejos de pigmentos separados espacialmente que son necesarios para aumentar la energía de un par de electrones lo suficiente como para eliminarlos de una molécula de agua y transferirlos a $NADP^+$. El fotosistema II aumenta los electrones desde un nivel de energía por debajo del nivel de mínimo del agua hasta aproximadamente el punto medio. (6.5)

**Grana.** Disposición ordenada y apilada de los tilacoides. (6.2)

**Heterótrofo.** Organismo que depende de una fuente externa de compuestos orgánicos. (6.1)

**P680.** Es el centro de reacción del fotosistema II. "P" significa pigmento, y "680" es la longitud de onda de luz que esta molécula absorbe con mayor intensidad. (6.5)

**P700.** Es el centro de reacción del fotosistema I. "P" significa pigmento, y "700" es la longitud de onda de luz que esta molécula absorbe con mayor intensidad. (6.5)

**Pigmentos.** Moléculas que contienen un cromóforo, un grupo químico capaz de absorber luz de una o varias longitudes de onda particulares dentro del espectro visible. (6.4)

**Plantas $C_3$.** Plantas que dependen únicamente de la ruta $C_3$ para fijar el $CO_2$ atmosférico. (6.9)

**Plantas $C_4$.** Plantas, principalmente hierbas tropicales, que utilizan la vía $C_4$ para la fijación de carbono. (6.10)

**Plantas CAM.** Plantas que utilizan PEP carboxilasa para la fijación de $CO_2$ al igual que las plantas $C_4$, pero realizan reacciones dependientes de la luz y fijación de carbono a diferentes horas del día, de modo que los estomas se pueden cerrar durante las horas pico de pérdida de agua en el transcurso del día. (6.10)

**Proplastidios.** Precursores no pigmentados de los cloroplastos. (6.2)

**Quimioautótrofo.** Un autótrofo que utiliza la energía almacenada en moléculas inorgánicas (como amoniaco, sulfuro de hidrógeno o nitritos) para convertir el $CO_2$ en compuestos orgánicos. (6.1)

**Reacciones dependientes de la luz.** La primera de dos series de reacciones que componen la fotosíntesis. En estas reacciones, la energía de la luz solar se absorbe y se convierte en energía química que se almacena en ATP y NADPH. (6.3)

**Reacciones independientes de la luz (reacciones oscuras).** Segunda de dos series de reacciones que componen la fotosíntesis. En estas reacciones los carbohidratos se sintetizan a partir del dióxido de carbono utilizando la energía almacenada en las moléculas de ATP y NADPH formadas en las reacciones dependientes de la luz. (6.3)

**Tilacoides.** Sacos membranosos aplanados formados por la membrana interna del cloroplasto, que contienen la maquinaria de transducción de energía para la fotosíntesis. (6.2)

**Unidad fotosintética.** un grupo de varios cientos de moléculas de clorofila que actúan en conjunto para atrapar fotones y transferir energía a la molécula de pigmento en el centro de reacción. (6.5)

**Vía $C_4$.** Vía alternativa para la fijación de carbono utilizando fosfoenolpiruvato como aceptor de $CO_2$ para producir compuestos de cuatro carbonos (predominantemente malato y oxalacetato). (6.10)

# Capítulo 7



**Adhesiones focales.** Estructuras adhesivas características de las células cultivadas que se adhieren a la superficie de una placa de cultivo. La membrana plasmática en la región de la adhesión focal contiene grupos de integrinas que conectan el material extracelular, el cual recubre el plato de cultivo con el sistema de microfilamentos, que contiene la actina del citoesqueleto. (7.6)

**Cadherinas.** Familia de glucoproteínas relacionadas que median la adhesión célula-célula dependiente del $Ca^{2+}$. (7.7)

**Colágenos.** Familia de glucoproteínas fibrosas conocidas por su alta resistencia a la tracción que funcionan de forma exclusiva como parte de la matriz extracelular. (7.3)

**Conexona.** Complejo de multisubunidades de una unión gap formada a partir del agrupamiento dentro de la membrana plasmática de una proteína de membrana integral llamada conexina. Cada conexona se compone de seis subunidades de conexina dispuestas alrededor de una abertura central (o anillo) de aproximadamente 1.5 nm de diámetro. (7.12)

**Desmosomas** (*maculae adherens*). Unión adhesiva en forma de disco que contiene cadherinas que se encuentran en una variedad de tejidos, pero con mayor predominio de epitelios, donde se localizan basales a la unión adherente. Las placas citoplásmicas densas en la superficie interna de las membranas plasmáticas en esta región sirven como sitios de anclaje para la formación de filamentos intermedios que se extienden hacia el citoplasma. (7.9)

**Glucocálix.** Capa estrechamente aplicada a la superficie externa de la membrana plasmática. Contiene carbohidratos de membrana junto con materiales extracelulares que la célula ha secretado en el espacio externo, donde permanecen estrechamente asociados con la superficie de la célula. (7.2)

**Hemicelulosas.** Polisacáridos ramificados de la pared celular de las plantas cuya columna vertebral está constituida por un azúcar, como la glucosa, y cadenas laterales de otros azúcares, como la xilosa. (7.14)

**Hemidesmosoma.** Estructura adhesiva especializada en la superficie basal de las células epiteliales que funciona para unir las células a la membrana basal subyacente. El hemidesmosoma contiene una placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática, con filamentos que contienen queratina en el citoplasma. (7.6)

**Integrinas.** Una superfamilia de proteínas integrales de membrana que se unen específicamente a las moléculas extracelulares. (7.5)

**Matriz extracelular** (ECM, *extracellular matrix*). Red organizada de materiales extracelulares que está presente más allá de las inmediaciones de la membrana plasmática. Puede desempeñar una función integral en la determinación de la forma y las actividades de la célula. (7.2)

**Membrana basal (lámina basal).** Capa engrosada de aproximadamente 50 a 200 nm de matriz extracelular que rodea las células musculares y adiposas, y subyace a la superficie basal de los tejidos epiteliales, como la piel, el revestimiento interno de los tractos digestivo y respiratorio y el revestimiento interno de los vasos sanguíneos. (7.2)

**Metaloproteinasas de matriz** (MMP, *matrix metalloproteinases*). Familia de enzimas que contienen zinc, las cuales actúan en el espacio extracelular para digerir varias proteínas extracelulares y proteoglucanos. (7.4)

**Metástasis.** Diseminación de células cancerosas desde un tumor primario hasta sitios distantes en el cuerpo donde puede surgir la formación de tumores secundarios. (7.8)

**Microfibrillas.** Paquetes de moléculas de celulosa que confieren rigidez a la pared celular y proporcionan resistencia a las fuerzas de tracción. (7.14)

**Pared celular.** Estructura rígida, no viva, que proporciona soporte y protección para la célula que rodea. (7.14)

**Paredes primarias.** Paredes de una célula vegetal en crecimiento. Permiten la extensibilidad. (7.14)

**Paredes secundarias.** Células más gruesas que se encuentran en la mayoría de las células vegetales maduras. (7.14)

**Pectinas.** Una clase heterogénea de polisacáridos cargados de manera negativa que forman la matriz de la pared celular de la planta. Las pectinas retienen agua y forman un gel que llena los espacios entre los elementos fibrosos. (7.14)

**Placa celular.** Estructura entre el citoplasma de dos células hijas recién formadas que origina una nueva pared celular en las células vegetales. (7.14)

**Plasmodesmos** (singular, plasmodesmo). Canales citoplasmáticos, de 30 a 60 nm de diámetro, que conectan la mayoría de las células vegetales y se extienden entre las células adyacentes de forma directa a través de la pared celular. Los plasmodesmos están revestidos con una membrana plasmática y generalmente contienen una estructura central densa, el desmotúbulo, derivado del retículo endoplasmático de las dos células. (7.12)

**Proteínas.** Grupo estructural y funcionalmente diverso de polímeros formados con monómeros de aminoácidos. (7.14)

**Proteoglucano**. Un complejo proteína-polisacárido que consiste en una molécula de proteína central a la que están unidas las cadenas de glucosaminoglicanos. Debido a la naturaleza ácida de los glucosaminoglucanos, los proteoglucanos son capaces de unir un gran número de cationes, que a su vez atraen a una gran cantidad de moléculas de agua. Como resultado, los proteoglucanos forman un gel poroso e hidratado que actúa como un material de "empaquetado" para resistir la compresión. (7.3)

**Selectinas.** Familia de glucoproteínas integrales de membrana que reconoce y se une a disposiciones específicas de grupos de carbohidratos que se proyectan desde la superficie de otras células. (7.7)

**Señalización transmembrana.** Transferencia de información a través de la membrana plasmática. (7.10)

**Síndrome de Usher.** Trastorno genético caracterizado por problemas de audición y visión. (7.7)

**Superfamilia de inmunoglobulinas** (IgSF, *inmunoglobulin superfamily*). Una amplia variedad de proteínas que contienen dominios compuestos de 70 a 110 aminoácidos que son homólogos a los dominios que forman las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos transportados por la sangre. (7.7)

**Tejido conectivo.** Tejido que consiste principalmente en una variedad de fibras distintas que interactúan entre sí de maneras específicas. La capa más profunda de la piel (la dermis) es un tipo de tejido conectivo. (7.1)

**Tejido epitelial.** Tejido compuesto por células muy compactas que recubren los espacios dentro del cuerpo. La capa externa de la piel (la epidermis) es un tipo de tejido epitelial. (7.1)

**Transición epitelial-mesenquimal** (ETM, *epithelial mesenchymal transition*). Proceso en el que las células epiteliales se desprenden de las células vecinas y migran, y se forman células madre mesenquimales. Estas células pueden continuar por diferenciarse en una variedad de tipos de células. (7.7)

**Uniones adherentes** (*zonulae adherens*). Las uniones adherentes son un tipo particular de unión adhesiva especializada particu-

larmente común en los epitelios. Las membranas plasmáticas en esta región están separadas por 20 a 35 nm y son sitios donde se concentran las moléculas de cadherina. Las células se mantienen unidas mediante enlaces entre los dominios extracelulares de las moléculas de cadherina que enlazan el espacio entre las células vecinas. (7.9)

**Uniones estrechas.** Contactos especializados que se producen en el extremo más apical del complejo de unión entre las células epiteliales adyacentes. Las membranas contiguas hacen contacto en puntos intermitentes, donde se unen las proteínas integrales de las dos membranas adyacentes. (7.11)

**Uniones gap**. Sitios entre células animales especializadas en la comunicación intercelular. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes se encuentran a aproximadamente 3 nm una de la otra, y el gap está atravesado por “conductos” muy finos o conexiones que permiten el paso de pequeñas moléculas. (7.12)

# Capítulo 8



**Autofagia.** La destrucción de los organelos y su reemplazo por otro que está rodeado de una doble membrana. La membrana que rodea al organelo luego se fusiona con un lisosoma. (8.15)

**Autorradiografía**. Técnica para visualizar procesos bioquímicos que permite a un investigador determinar la ubicación de los materiales marcados radioactivamente dentro de una célula. Las secciones tisulares que contienen isótopos radioactivos se cubren con una capa delgada de emulsión fotográfica, que se expone por la radiación que emana del tejido. Los sitios en las células que contienen radiactividad son revelados bajo el microscopio por granos de plata después del desarrollo de la emulsión suprayacente. (8.2)

**Cisterna.** Uno de los numerosos sacos de membrana aplanados que componen el aparato de Golgi. (8.3)

**Cisterna *cis*.** Las cisteRNA del complejo de Golgi más cercanas al retículo endoplásmico. (8.9)

**Cisterna media.** Compartimientos del aparato de Golgi que se encuentran en el centro del organelo, entre las cisteRNA *cis* y *trans*. (8.9)

**Complejo de Golgi.** Red de membranas lisas organizadas en una morfología característica, que consiste en cisteRNA aplanadas, en forma de disco, con bordes dilatados y vesículas y túbulos asociados. El complejo de Golgi funciona principalmente como una planta de procesamiento donde las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico se modifican de maneras específicas. (8.9)

**Control de calidad.** Las células contienen diversos mecanismos que aseguran que las proteínas y los ácidos nucleicos que sintetizan tienen la estructura apropiada. Por ejemplo, las proteínas mal plegadas son translocadas fuera del ER y destruidas por los proteasomas en el citosol; los mRNA que contienen codones de terminación prematura se reconocen y destruyen; y las anomalías (lesiones) que contienen DNA son reconocidas y reparadas. (8.6)

**Dolicol fosfato.** Molécula hidrofóbica construida a partir de más de 20 unidades de isopreno que ensambla el segmento basal, o núcleo, de la cadena de carbohidratos en las glucoproteínas. (8.6)

**Endocitosis mediada por receptor** (RME, *receptor-mediated endocytocis*). Mecanismo endocítico que requiere la unión de moléculas de soluto como LDL o transferrina a un receptor específico de superficie celular. (8.17)

**Endocitosis.** Mecanismo para la captación de fluidos y solutos en una célula. Se puede dividir en dos tipos. endocitosis en fase masiva, que no es específica, y *endocitosis mediada por receptor* (RME), que requiere la unión de moléculas de soluto como LDL o transferrina a un receptor de superficie celular específico. (8.17)

**Endosomas.** Organelos de la vía endocítica. Los materiales absorbidos por la endocitosis se transportan a *los endosomas tempranos* donde se clasifican, y luego a *los endosomas tardíos* y finalmente a los lisosomas. Los endosomas tardíos también funcionan como sitios de destino de las enzimas lisosómicas transportadas desde el complejo de Golgi. (8.19)

**Espacio luminal (cisternal).** La región del contenido líquido del citoplasma encerrado por las membranas del retículo endoplasmático o del complejo de Golgi. (8.3)

**Exocitado.** Haber experimentado exocitosis o haber entregado fuera de la célula. (8.1)

**Exocitosis.** Proceso de fusión de membrana y descarga de contenido durante el cual la membrana de un gránulo o vesícula secretora entra en contacto con la membrana plasmática subyacente con la que se fusiona, formando una abertura a través de la cual se puede liberar el contenido del gránulo o vesícula. (8.14)

**Fagocitosis**. Proceso mediante el cual se toman materiales particulados en las células. Los materiales están encerrados dentro de un pliegue de la membrana plasmática, que se abre hacia el citoplasma para formar una vesícula llamada fagosoma. (8.17)

**Fraccionamiento subcelular.** Un enfoque que permite que diferentes organelos (por ejemplo, núcleo, mitocondria, membrana plasmática, retículo endoplásmico) tengan propiedades diferentes, para que se separen entre sí. (8.2)

**GGA.** Una proteína adaptadora que consta de varios dominios distintos. (8.11)

**Glucosiltransferasas.** Una gran familia de enzimas que transfieren azúcares específicos de un donante específico (un azúcar nucleotídico) a un receptor específico (generalmente el extremo creciente de una cadena de oligosacáridos). (8.6)

**Gránulo secretor.** Estructura grande, densamente empaquetada, unida a la membrana que contiene materiales secretores altamente concentrados que se descargan en el espacio extracelular (secretados) después de una señal estimulante. (8.1)

**Hidrolasas ácidas.** Enzimas hidrolíticas con actividad óptima a un pH ácido. (8.15)

**Homogeneizar.** Para romper mecánicamente las células. (8.2)

**Microsomas.** Una colección heterogénea de vesículas formadas a partir del sistema de endomembrana (principalmente el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi) después de la homogeneización. (8.2)

**Partícula de reconocimiento de señal** (SRP, *signal recognition particle*). Partícula que consta de seis polipéptidos distintos y una pequeña molécula de RNA, llamada RNA 7S, que reconoce la secuencia de señal a medida que emerge del ribosoma. La SRP se une a la secuencia de señal y luego a una membrana de ER. (8.4)

**Peptidasa de señal.** Enzima proteolítica que elimina la porción N-terminal que incluye el péptido señal de un polipéptido naciente sintetizado en el RER. (8.4)

**Pozos recubiertos.** Dominios especializados de la membrana plasmática; los pozos revestidos sirven como puntos de recolección para receptores que unen sustancias que ingresan a una célula por medio de endocitosis. (8.17)

**Proteínas de transferencia de lípidos.** Facilitan el movimiento de lípidos específicos desde el ER a otros organelos sin la participación de vesículas de transporte. (8.5)

**Proteínas de unión a GTP (o proteínas G).** Con funciones reguladoras clave en muchos procesos celulares diferentes, las proteínas G pueden estar presentes en al menos dos conformaciones alternativas, una forma activa que contiene una molécula de GTP unida y una forma inactiva que contiene una molécula de GDP unida. (8.4)

**Rabs.** Una familia de proteínas G monoméricas involucradas en el tráfico de vesículas. (8.13)

**Recambio.** La destrucción regulada de materiales celulares y su reemplazo. (8.15)

**Receptor SRP.** Situado dentro de la membrana del ER, el receptor SRP se une de manera específica con el complejo SRP-ribosoma. (8.4)

**Red *cis* Golgi** (CGN, *cis Golgi network*). La cara más *cis* del organelo que se compone de una red interconectada de túbulos ubicada en la entrada más cercana al ER. Se cree que la CGN funciona principalmente como una estación de clasificación que distingue entre las proteínas que se enviarán de nuevo al ER y las que pueden pasar a la siguiente estación de Golgi. (8.9)

**Red *trans* Golgi** (TGN). Red de elementos tubulares interconectados en el *trans* final del complejo de Golgi que ordena y dirige

las proteínas para su destino final celular o extracelular. (8.9)

**Respuesta de proteína desplegada** (UPR, *unfolded protein response*). Respuesta integral que se produce en células cuyas cisteRNA de ER contienen una concentración excesiva de proteínas desdobladas o plegadas incorrectamente. Los sensores que detectan esta situación desencadenan una vía que conduce a la síntesis de proteínas (p. ej., chaperonas moleculares) que pueden aliviar el estrés en el ER. (8.7)

**Retículo endoplásmico** (ER, *endoplasmic reticulum*). Sistema de túbulos, cisteRNA y vesículas que divide el contenido de líquido del citoplasma en un espacio luminal dentro de la membrana del ER y un espacio citosólico en el exterior de las membranas. (8.3)

**Retículo endoplásmico liso** (SER, *smooth endoplasmic reticulum*). La parte del retículo endoplásmico sin ribosomas unidos. Los elementos membranosos del SER son típicamente tubulares y forman un sistema de interconexión de tuberías que se curvan a través del citoplasma en el que se producen. Las funciones del SER varían de una célula a otra e incluyen la síntesis de hormonas esteroides, la desintoxicación de una amplia variedad de compuestos orgánicos, la movilización de glucosa a partir de glucosa 6-fosfato y el secuestro de iones de calcio. (8.3)

**Retículo endoplásmico rugoso** (RER, *receptor-mediated endocytosis*). La parte del retículo endoplásmico que tiene unidos los ribosomas. El RER aparece como un organelo membranoso extenso compuesto principalmente de sacos aplanados (**cisternas**) separados por un espacio citosólico. Las funciones del RER incluyen síntesis de proteínas secretoras, proteínas lisosómicas, proteínas integrales de membrana y lípidos de membrana. (8.3)

**Secretado.** Descargado fuera de la célula. (8.1)

**Secreción constitutiva.** Descarga de materiales sintetizados en la célula en el espacio extracelular de forma continua. (8.1)

**Secreción regulada.** Descarga de materiales sintetizados en la célula que se han almacenado en gránulos secretores unidos a la membrana en las regiones periféricas del citoplasma, que se producen en respuesta a un estímulo apropiado. (8.1)

**Secuencia de señal.** Serie especial de aminoácidos localizados en la porción N-terminal de las proteínas recién formadas que desencadena la unión del ribosoma formador de proteína a una membrana del ER y el movimiento del polipéptido naciente en el espacio cisternal del ER. (8.4)

**Sistema de endomembrana.** Grupo de organelos citoplásmicos membranosos funcionales y estructuralmente interrelacionados que incluyen el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, los endosomas, los lisosomas y las vacuolas. (8.1)

**Sistema libre de células.** Sistema experimental para estudiar actividades celulares que no requieren células completas. Tales sistemas típicamente contienen una preparación de proteínas purificadas y/o fracciones subcelulares y son susceptibles de manipulación experimental. (8.2)

**SNARE.** Proteínas clave que median en el proceso de fusión de membranas. Los *t-SNARE* se encuentran en las membranas de los compartimientos blanco. Los *v-SNARE* se incorporan en las membranas de las vesículas de transporte durante la gemación. (8.13)

**Tonoplasto**. La membrana que limita la vacuola de una célula vegetal. (8.16)

***Trans*cisterna.** Los compartimientos del aparato de Golgi que albergan la catálisis de las modificaciones tardías de las proteínas, y son típicamente distales del núcleo y del ER. (8.9)

**Translocón.** Canal revestido de proteínas incrustado en la membrana del ER; el polipéptido naciente puede moverse a través del translocón en su paso del citosol a la luz del ER. (8.4)

**Trastorno de almacenamiento lisosomal.** Enfermedad caracterizada por la deficiencia de una enzima lisosomal y la correspondiente acumulación de sustrato no degradado. (HP8.12)

**Vacuola.** Una estructura simple llena de fluido, unida a la membrana, que comprende 90% del volumen de muchas células vegetales. (8.16)

**Vesículas recubiertas.** Las vesículas que brotan de un compartimiento de membrana típicamente poseen una capa de proteína de subunidades múltiples que promueve el proceso de gemación y se une a proteínas de membrana específicas. Las vesículas revestidas con *COPI-, COPII* y *clatrina* son las vesículas recubiertas mejor caracterizadas. (8.10)

**Vía biosintética (vía secretoria)**. Ruta a través del citoplasma mediante el cual los materiales se sintetizan en el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi, se modifican durante el paso a través del complejo de Golgi y se transportan dentro del citoplasma a diversos destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma o gran vacuola de una célula vegetal. La vía secretoria alternativa se ha utilizado porque muchos de los materiales sinte-tizados en la vía están destinados a ser descargados (secretados) fuera de la célula. (8.1)

**Vía endocítica.** Ruta para mover materiales desde fuera de la célula (y desde la superficie de la membrana de la célula) a compartimientos, como endosomas y lisosomas, ubicados dentro del interior de la célula. (8.1)

**Vía secretoria (vía biosintética).** Ruta a través del citoplasma mediante el cual los materiales se sintetizan en el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi, se modifican durante el paso a través del complejo de Golgi y se transportan dentro del citoplasma a diversos destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma o una gran vacuola de una célula vegetal. Muchos de los materiales sintetizados en el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi están destinados a ser descargados fuera de la célula; de ahí que se haya utilizado el término vía secretoria. (8.1)

# Capítulo 9



**Acoplamiento excitación-contracción.** Los pasos que unen la llegada de un impulso nervioso a la membrana plasmática del músculo con el acortamiento de los sarcómeros en las profundidades de la fibra muscular. (9.12)

**Actina.** Una proteína citoesquelética globular que se polimeriza para formar un filamento helicoidal flexible capaz de interactuar con la miosina. Los filamentos de actina proporcionan soporte mecánico para las células eucarióticas, determinan la forma de la célula y permiten el movimiento de las células. (9.10)

**Axonema.** El núcleo central que contiene microtúbulos de un cilio o flagelo. La mayoría de los axonemas constan de nueve dobletes periféricos, dos microtúbulos centrales y numerosas estructuras accesorias. (9.7)

**Centriolos.** Estructuras cilíndricas, de aproximadamente 0.2 µm de ancho y el doble de largas, que contienen nueve fibrillas espaciadas uniformemente, cada una de las cuales aparece en sección transversal como una banda de tres microtúbulos. Los centriolos casi siempre se encuentran en pares, con cada uno de los miembros situados en ángulos rectos entre sí. (9.5)

**Centros organizadores de microtúbulos** (MTOC, *microtubule- organizing centers*). Una variedad de estructuras especializadas que desempeñan un papel en el inicio de la formación de microtúbulos. (9.5)

**Centrosoma.** Estructura compleja que contiene dos centriolos en forma de barril rodeados por *material pericentriolar* amorfo y electrodenso (PCM, *pericentriolar material*) donde se nuclean los microtúbulos. (9.5)

**Cilios.** Organelos móviles capilares que se proyectan desde la superficie de una variedad de células eucariotas. Los cilios tienden a producirse en grandes cantidades en la superficie de una célula. (9.7)

**Cinesina.** Proteína motora dirigida al extremo que mueve las vesículas membranosas y otros organelos a lo largo de los microtúbulos a través del citoplasma. La cinesina es un miembro de una familia de *proteínas relacionadas con cinesina* (KRP, *kinesin related-proteins*). (9.3)

**Citoesqueleto.** Una red interactiva elaborada compuesta de tres estructuras filamentosas bien definidas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Estos elementos funcionan para proporcionar soporte estructural; un marco interno responsable de posicionar los diversos organelos dentro del interior de la celda; como parte de la maquinaria requerida para el movimiento de materiales y organelos dentro de las celdas; como elementos generadores de fuerza responsables del movimiento de células de un lugar a otro; como sitios para anclar RNA mensajeros y facilitar su traducción a polipéptidos; y como un transductor de señal, que transmite información desde la membrana celular al interior de la célula. (9.1)

**Cono de crecimiento.** La punta distal de una neurona en crecimiento que contiene la actividad locomotora requerida para la extensión axonal. (9.16)

**Cuerpo basal.** Una estructura que reside en la base del cilio o flagelo y que genera sus microtúbulos externos. Los cuerpos basales son idénticos en estructura a los centriolos. Cada uno puede dar lugar al otro. (9.5)

**Dineína ciliar.** Una proteína enorme (hasta 2 millones de daltones) responsable de la conversión de la energía química de ATP en la energía mecánica de la locomoción ciliar. (9.8)

**Dineína citoplásmica.** Una proteína enorme (masa molecular de más de 1 millón de daltones) compuesta de numerosas cadenas polipeptídicas. La molécula contiene dos cabezas globulares grandes que actúan como motores generadores de fuerza. La evidencia sugiere que la dineína citoplásmica funciona en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y también como un motor microtubular negativo dirigido a los extremos para el movimiento de las vesículas y los organelos membranosos a través del citoplasma. (9.3)

**Dineína.** Una proteína motora de múltiples unidades portadora de carga excepcionalmente grande que se mueve a lo largo de los microtúbulos hacia su extremo negativo. Esta familia de proteínas se presenta como dineínas citoplásmicas y dineínas axilares o ciliares. (9.3)

**Fibra muscular.** Una célula del músculo esquelético, conocida como fibra muscular debido a su estructura altamente ordenada, multinucleada, tipo cable, compuesta de cientos de miofibrillas cilíndricas más delgadas. (9.12)

**Filamentos delgados.** Uno de los dos tipos distintos de filamentos que dan a los sarcómeros su apariencia característica. Los filamentos delgados consisten principalmente en actina y están dispuestos en una disposición hexagonal alrededor de cada filamento grueso, con cada filamento delgado situado entre dos filamentos gruesos. (9.12)

**Filamentos gruesos.** Uno de los dos tipos distintos de filamentos que dan a los sarcómeros su apariencia característica. Los filamentos gruesos consisten principalmente en miosina y están rodeados por una serie hexagonal de finos filamentos. (9.12)

**Filamentos intermedios** (IF, *intermediate filaments*). Fibras citoesqueléticas robustas, fuertes, de aproximadamente 10 nm de diámetro que, dependiendo del tipo de célula, pueden estar compuestas de una variedad de subunidades proteicas capaces de ensamblarse en tipos de filamentos similares. Se cree que los IF proporcionan estabilidad mecánica a las células y proporcionan funciones especializadas específicas de tejido. (9.1)

**Flagelos.** Organelos capilares móviles que se proyectan desde la superficie de una variedad de células eucariotas. Esencialmente tienen la misma estructura que los cilios, pero están presentes en un número mucho menor. (9.7)

**Gammatubulina.** Un tipo de tubulina que desempeña un componente crítico en la nucleación de microtúbulos. (9.5)

**Inestabilidad dinámica.** Término que se relaciona con las propiedades de ensamblaje/desensamblaje del extremo positivo de un microtúbulo. El término describe el hecho de que los microtúbulos que crecen y se encogen pueden coexistir en la misma región de una célula, y que un microtúbulo dado puede alternar de forma impredecible entre las fases de crecimiento y acortamiento. (9.6)

**Lamelipodio.** El borde de ataque de un fibroblasto en movimiento, que se extiende desde la célula como una proyección ancha, aplanada y en forma de velo que se desliza sobre el sustrato. (9.14)

**Material pericentriolar** (PCM, *pericentriolar material*). Material amorfo y denso de electrones que rodea los centriolos en una célula animal. (9.5)

**Microfilamentos.** Estructuras sólidas de 8 nm de grosor, citoesqueléticas, compuestas por un polímero de doble hélice de la proteína actina. Juegan un papel clave en prácticamente todos los tipos de contractilidad y motilidad dentro de las células. (9.9)

**Microtúbulos.** Estructura citoesquelética cilíndrica hueca, de 25 nm de diámetro, cuya pared está compuesta por la proteína tubulina. Los microtúbulos son polímeros ensamblados a partir de heterodímeros de alfa-betatubulina que están dispuestos en filas o protofilamentos. Debido a su rigidez, los microtúbulos a menudo actúan en una capacidad de apoyo. (9.1)

**Miofibrillas.** Los hilos finos y cilíndricos que se encuentran dentro de las fibras musculares. Cada miofibrilla está compuesta por repetidas series lineales de unidades contráctiles, llamadas sarcómeras, que dan

a las células del músculo esquelético su aspecto estriado. (9.12)

**Miosinas convencionales (o tipo II).** Familia de las miosinas, identificadas por primera vez en el tejido muscular, que son los motores principales para la contracción muscular pero también se encuentran en una variedad de células que no son de músculo. Las miosinas tipo II son necesarias para dividir una célula en dos durante la división celular, generando tensión en las adherencias focales y el comportamiento de giro de los conos de crecimiento. (9.11)

**Neurofilamentos.** Grupos de filamentos intermedios, agrupados de forma suelta, ubicados dentro del citoplasma de las neuronas. Los neurofilamentos tienen ejes largos que están orientados paralelamente al axón de la célula nerviosa y están compuestos por tres proteínas distintas. NF-L, NF-H y NF-M. (9.9)

**Progreso.** Término aplicado a proteínas (p. ej., cinesina o RNA polimerasa) que son capaces de desplazarse distancias considerables a lo largo de su pista o plantilla (p. ej., un microtúbulo o una molécula de DNA) sin disociarse de ella. (9.3)

**Proteínas asociadas a microtúbulos** (MAP, *microtubule-associated proteins*). Distintas proteínas de tubulina contenidas en microtúbulos obtenidos de células. Las MAP pueden interconectar microtúbulos para formar haces y se pueden ver como puentes cruzados que conectan microtúbulos entre sí. Otras MAP pueden aumentar la estabilidad de los microtúbulos, alterar su rigidez o influir en la velocidad de su ensamblaje. (9.2)

**Proteínas de unión a actina.** Cualquiera de las casi 100 proteínas diferentes que pertenecen a numerosas familias que afectan el ensamblaje de los filamentos de actina, sus propiedades físicas y sus interacciones entre sí y con otros organelos celulares. (9.13)

**Proteínas motoras.** Proteínas que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para generar fuerzas mecánicas que impulsan la proteína, así como la carga unida, a lo largo de uno de los componentes del citoesqueleto. Se conocen tres familias de proteínas motoras: las quininas y las dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos y las miosinas se mueven a lo largo de los microfilamentos. (9.2)

**Protofilamentos.** Filas dispuestas longitudinalmente de subunidades globulares de un microtúbulo que están alineadas paralelas al eje largo del túbulo. (9.2)

**Retículo sarcoplásmico** (SR, *sarcoplasmic reticulum*). Sistema de membranas de SER citoplasmáticas que codifican $Ca^{2+}$ en las células musculares que forma una manga membranosa alrededor de la miofibrilla. (9.12)

**Sarcómeros.** Unidades contráctiles de miofibrillas que están dotadas de un patrón característico de bandas que dan a las células del músculo esquelético su aspecto estriado. (9.12)

**Transporte intraflagelar** (IFT, *intraflagellar transport*). Un proceso en el cual las partículas se mueven en ambas direcciones entre la base de un flagelo o cilio y su punta. La fuerza que impulsa el IFT es generada por las proteínas motoras que siguen a lo largo de los dobletes periféricos del axonema. (9.7)

**Túbulos transversales** (T, *transverse*). Pliegues membranosos a lo largo de los cuales se propaga el impulso generado en una célula del músculo esquelético en el interior de la célula. (9.12)

**Unión neuromuscular.** El punto de contacto de un término de un axón con una fibra muscular, la unión neuromuscular es un sitio de transmisión de impulsos nerviosos desde el axón a través de la hendidura sináptica hasta la fibra muscular. (9.12)

# Capítulo 10



**Alelos.** Formas alternativas del mismo gen. (10.1)

**Análisis de composición de base.** Cantidades relativas de cada base en varias muestras de DNA. (10.5)

**Complementaria.** Relación entre la secuencia de bases en las dos cadenas de la doble hélice de DNA. Las restricciones estructurales en las configuraciones de las bases limitan la unión a los dos pares: adenina-timina y guanina-citosina. (10.5)

**Cromosomas.** Cadenas de hebras que están compuestas por el DNA nuclear de las células eucariotas, portadores de la información genética. (10.2)

**Cromosomas homólogos.** Cromosomas emparejados de células diploides, cada uno de los cuales lleva una de las dos copias del material genético que porta ese cromosoma. (10.3)

**Cromosomas politénicos.** Cromosomas gigantes de insectos que contienen, perfectamente alineadas, cadenas duplicadas de DNA, tanto como 1 024 veces el número de cadenas de DNA de cromosomas normales. (10.4)

**Desnaturalización.** Separación de la doble hélice del DNA en sus dos cadenas componentes. (10.8)

**Diploide.** Que contiene ambos miembros de cada par de cromosomas homólogos, como se ejemplifica en la mayoría de las células somáticas. Las células diploides se producen a partir de células diploides parentales durante la mitosis. Contrasta con haploide. (10.10)

**DNA microsatélite.** Secuencias cortas (1-9 pares de bases) presentes en pequeños grupos de, aproximadamente, 10 a 40 pares de bases de longitud, que a menudo se encuentran dispersas por todo el genoma. (10.8)

**DNA minisatélite.** Secuencias de 10-100 pares de bases que se encuentran en grupos que contienen hasta 3 000 repeticiones. (10.8)

**DNA satelitales.** Secuencias cortas (5-100 pares de bases de longitud) que forman grandes matrices lineales en el genoma. (10.8)

**Duplicación génica.** Duplicación de una pequeña porción de un solo cromosoma, por lo general por un proceso de entrecruzamiento desigual. (10.10)

**Elementos transponibles.** Segmentos del DNA que se mueven de un lugar en un cromosoma a un sitio completamente diferente, que a menudo afecta la expresión génica. (10.11)

**Entrecruzamiento (recombinación genética).** Reorganización de los genes en los cromosomas (lo cual altera los grupos de enlace) que ocurre durante la meiosis, como resultado de la ruptura y fusión de segmentos de cromosomas homólogos. (10.4)

**Estudios de asociación de genoma completo** (GWAS, *Genome-wide association studies*). Estudio científico que busca descubrir si ciertas variantes genéticas están asociadas con un rasgo específico. (HP10.16)

**Fracción altamente repetida.** Secuencias de DNA por lo común cortas (unos pocos cientos de nucleótidos en su longitud) que están presentes en, al menos, $10^5$ copias por genoma. Las secuencias muy repetidas generalmente representan alrededor de 10% del DNA de los vertebrados. (10.8)

**Fracción no repetida.** Secuencias de DNA en el genoma que están presentes en una sola copia por conjunto haploide de cromosomas. Estas secuencias contienen la mayor cantidad de información genética, incluidos los códigos para, virtualmente, todas las proteínas, además de las histonas. (10.8)

**Fracciones moderadamente repetidas.** Secuencias de DNA que se repiten desde unos pocos a varios cientos de miles de veces dentro de un genoma eucariota. La fracción moderadamente repetida del DNA puede variar alrededor de 20 a 80% del DNA total. Estas secuencias pueden ser idénticas entre sí, o no idénticas, pero relacionadas. (10.8)

**Genes.** En términos no moleculares, una unidad de herencia que rige el carácter de un rasgo particular. En términos moleculares, un segmento de DNA que contiene la información para un solo polipéptido o molécula de RNA, incluyendo regiones transcritas, pero no codificadas. (10.1)

**Genoma.** Complemento de la información genética único para cada especie de organismo. Equivalente al DNA de un conjunto haploide de cromosomas de esa especie. (10.1)

**Grupos de enlace.** Grupos de genes que residen en el mismo cromosoma, causando la segregación no independiente de rasgos controlados por estos genes. (10.3)

**Haploide.** Que contiene sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Las células haploides se producen durante la meiosis, como lo ejemplifica el espermatozoide. Contrasta con diploide. (10.8)

**Haplotipo.** Bloque del genoma que tiende a ser heredado intacto de generación en generación. Los haplotipos por lo regular se definen por la presencia de una combinación consistente de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphisms*). (HP10.16)

**Hibridación *in situ* fluorescente** (FISH, *Fluorescence in situ hybridation*). Técnica en la que la sonda de DNA (o RNA) se marca con tintes fluorescentes, hibridizado con DNA de cadena simple que permanece dentro de su cromosoma, y se localiza con un microscopio de fluorescencia. (10.8)

***Locus*** (pl. ***loci***). Posición de un gen en un cromosoma. (10.4)

**Mutante.** Individuo que tiene una característica hereditaria que lo distingue del tipo salvaje. (10.4)

**Mutación.** Cambio espontáneo en un gen que lo altera de manera permanente, de forma que causa un cambio hereditario. (10.4)

**Nucleótido.** Monómero de DNA o RNA, que consiste en una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. (10.5)

**Poliploidización** (**duplicación del genoma completo**). Fenómeno en el que la descendencia tiene dos veces la cantidad de cromosomas en cada célula como sus padres diploides. Puede ser un paso importante en la evolución de una nueva especie. (10.10)

**Pseudogenes.** Secuencias que son claramente homólogas a genes funcionales, pero tienen mutaciones acumuladas que las hacen no funcionales. (10.10)

**Purina.** Una clase de base nitrogenada que se encuentra en los nucleótidos, que tiene una estructura de doble anillo, que incluye *adenina* y *guanina*, las cuales se hallan tanto en el DNA como en el RNA. (2.18, 10.5)

**Pirimidina.** Una clase de base nitrogenada que se encuentra en los nucleótidos, que tiene una estructura de un solo anillo, que incluye *citosina* y *timina*, las cuales se encuentran en el DNA, así como citosina y uracilo, que se encuentran en el RNA. (2.18, 10.5)

**Polimorfismos de un solo nucleótido** (SNP, *single nucleotide polymorphisms*). Sitios en el genoma donde se encuentran bases alteRNA con alta frecuencia en la población. Los SNP son excelentes marcadores genéticos para estudios de mapeo del genoma. (10.15)

**Polimorfismos genéticos.** Sitios en el genoma que varían con una frecuencia relativamente alta entre diferentes individuos en una población de especies. (10.15)

**Renaturalización (reasociación).** Reasociación de cadenas simples complementarias de un DNA de doble

hélice que había sido previamente desnaturalizado. (10.8)

**Repeticiones en tándem.** Clase de secuencias de DNA repetidas que incluyen DNA satélites, minisatélites y microsatélites. (10.8)

**Retrotransposones.** Elementos transponibles que requieren transcriptasa inversa para sus movimientos dentro del genoma. (10.11)

**Superenrollado.** Molécula de DNA que tiene más o menos 10 pares de bases por vuelta de la hélice. (10.7)

**Tipo salvaje.** Cepa original de un organismo vivo, de la que se crían otros organismos para la investigación. (10.4)

**Topoisomerasas.** Enzimas que se encuentran en células procariotas y eucariotas capaces de cambiar el estado superenrollado del DNA dúplex. Son esenciales en procesos, tales como la replicación y transcripción del DNA, que requieren el DNA dúplex para desenrollarse. (10.7)

**Transcriptasa inversa.** Polimerasa DNA dependiente de RNA. Una enzima que usa RNA como una plantilla para sintetizar una cadena complementaria de DNA. [Una enzima que se encuentra en virus que contienen RNA y se utiliza en el laboratorio para sintetizar cDNA.] (10.11)

**Transposición.** Movimiento de segmentos del DNA desde un lugar en un cromosoma a un sitio completamente diferente, que a menudo afecta la expresión génica. (10.11)

**Transposones.** Segmentos del DNA capaces de moverse de un lugar en el genoma a otro. (10.11)

# Capítulo 11



**Aminoacil-tRNA sintetasa** (aaRS, *aminoacyl-tRNA synthetase*). Enzima que une en forma covalente los aminoácidos a los extremos 3′ de su(s) tRNA(s) asociado(s). Cada aminoácido es reconocido por una aminoacil-tRNA sintetasa específica. (11.15)

**Anticodón.** Una secuencia de tres nucleótidos en cada tRNA que funciona en el reconocimiento del codón mRNA complementario. (11.15)

**Código genético.** Forma en que las secuencias de nucleótidos del DNA codifican la información para fabricar productos proteicos. (11.14)

**Codón de inicio.** Triplete AUG, el sitio en el cual el ribosoma se une al mRNA para asegurar que el ribosoma se encuentre en el marco de lectura adecuado para leer correctamente el mensaje completo. (11.16)

**Codones.** Secuencias de tres nucleótidos (tripletes de nucleótidos) en el mRNA que especifican aminoácidos. (11.14)

**Cola de poli(A).** Cadena de residuos de adenosina en el extremo 3′ de un mRNA añadido después de la transcripción. (11.7)

**Complejo de la unión de exones** (EJC, *exon-junction complex*). Un complejo de proteínas depositadas en los nucleótidos 20-24 transcriptos corriente arriba de la recién formada unión exón-exón. Este conglomerado de proteínas permanece con el mRNA hasta que se traduce. (11.18)

**Corrección de pruebas.** Proceso de corregir errores cometidos por una polimerasa después de haber incorporado un monómero. (11.2)

**CRISPR.** Una ruta de defensa basada en RNA empleada por las bacterias para defenderse contra los virus, que se ha convertido en una herramienta para la ingeniería de genomas eucarióticos (11.13)

**Degradación mediada por mutación terminadora** (NMD, *nonsense-mediated decay*). Un mecanismo de vigilancia del mRNA que detecta los mRNA que contienen codones de terminación prematura (sin sentido), y los conduce a su destrucción. (11.18)

**Dogma central.** El concepto de que el DNA contiene la información para hacer RNA, y el RNA contiene la información para producir proteínas. (11.1)

**Empalme de RNA.** El proceso de eliminación de las secuencias de DNA intermedias (intrones) a partir de una transcripción primaria. (11.7)

**Espliceosoma.** Complejo macromolecular que contiene una variedad de proteínas y diversas partículas de ribonucleoproteínas distintas, que funciona en la eliminación de intrones de un transcripto primario. (11.7)

**Exones.** Aquellas partes de un gen dividido que contribuyen a un producto de RNA maduro. (11.6)

**Expresión génica.** Producción de mRNA, y eventualmente de proteína, por un gen determinado. (11.1)

**Factores de inicio.** Proteínas solubles (IF en bacterias y elF en eucariotas) que posibilitan el inicio de la traducción. (11.16)

**Factores de transcripción.** Proteínas auxiliares (más allá de los polipéptidos que forman las RNA polimerasas) que se unen a sitios específicos en el DNA y alteran la transcripción de los genes cercanos. (11.2, 12.4)

**Factores generales de transcripción (GTF, *general transcription factors*).** Proteínas auxiliares necesarias para que la RNA polimerasa inicie la transcripción. Estos factores se llaman "generales" porque son necesarios para que la polimerasa haga la transcripción de una diversidad de genes. (11.5)

**Genes divididos.** Genes con secuencias intermedias. (11.6)

**Interferencia de RNA** (RNAi, *RNA interference*). Fenómeno natural en el que los RNA de doble cadena (dsRNA, *doublestranded RNA*) conducen a la degradación de los mRNA que tienen secuencias idénticas. Se cree que el RNAi funciona principalmente al bloquear la replicación de virus y restringir el movimiento de elementos móviles, los cuales implican la formación de intermediarios de dsRNA. Se puede hacer que las células de mamíferos participen en la RNAi por tratamiento de las células con RNA pequeños (21 nt). Estos pequeños RNA (siRNA, *small RNA*) inducen la degradación de los mRNA que contienen la misma secuencia. (11.10)

**Intrones.** Aquellas partes de un gen dividido que corresponden a las secuencias intermedias. (11.6)

**Marco de lectura.** División de una secuencia de RNA en grupos de tres nucleótidos que constituyen codones. (11.16)

**MicroRNA (miRNA).** RNA pequeños (20-23 nucleótidos de longitud) que se sintetizan a partir de muchos sitios en el genoma, y participan en la inhibición de la traducción o en el aumento de la degradación de los mRNA complementarios. (11.12)

**Mundo de RNA.** Etapa propuesta en la evolución temprana de la vida, antes de la aparición del DNA y las proteínas, en las que las moléculas de RNA sirvieron como material genético y como catalizadores. (11.0)

**Mutaciones de cambio de marco.** Mutaciones en las que un solo par de bases se agrega o se elimina del DNA, lo que da como resultado un marco de lectura incorrecto desde el punto de mutación hasta el resto de la secuencia de codificación. (11.17)

**Mutaciones sin sentido.** Mutaciones que producen codones de parada dentro de los genes y causan la terminación prematura de la cadena polipeptídica codificada. (11.18)

**Nucléolos.** Estructuras nucleares de forma irregular que funcionan como organelos productores de ribosomas. (11.4)

**Peptidil transferasa.** Porción de una gran subunidad ribosómica que es responsable de catalizar la formación del enlace peptídico; la actividad de la peptidil transferasa reside en la gran molécula de RNA ribosomal. (11.17)

**Polirribosoma (polisoma).** Complejo formado por un mRNA y varios ribosomas en el proceso de traducción de ese mRNA. (11.19)

**Pre-RNA.** Molécula de RNA que aún no se ha procesado en su forma madura final (p. ej., pre-mRNA, pre-rRNA, o pre-tRNA). (11.3)

**Promotor.** Sitio en el DNA al que se une una molécula de RNA polimerasa antes de iniciar la transcripción. El promotor contiene información que determina cuál de las dos cadenas de DNA se transcribe, y el sitio en el que comienza la transcripción. (11.2, 12.1)

**rDNA.** Secuencias de DNA que codifican el rRNA, que normalmente se repiten cientos de veces y que por lo general están agrupadas en una o algunas regiones del genoma. (11.4)

**RNA pequeño de interferencia** (siRNA, *small interfering RNA*) Se forman fragmentos pequeños (21-23 nucleótidos) de doble cadena cuando el RNA bicatenario inicia la respuesta durante el silenciamiento del RNA. (11.0)

**RNA pequeño nucleolar** (snoRNA, *small, nucleolar RNA*). RNA necesarios para la metilación y la pseudouridilación de pre-rRNA durante la formación de ribosomas en el nucléolo. (11.4)

**RNA asociados a Piwi** (piRNA, *piwi-interacting*). Pequeños RNA (24-32 bases) que están codificados por un pequeño número de grandes *loci* genómicos, y

actúan para suprimir el movimiento de elementos de transposición en las células germinales. Los piRNA se derivan de precursores monocatenarios y no requieren Dicer para su procesamiento. (11.12)

**Reordenamiento de exones.** Movimiento de "módulos" genéticos entre genes no relacionados facilitado por la presencia de intrones; los intrones actúan como elementos espaciadores inertes entre los exones. (11.8)

**Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP, *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*).** Resultado de la transcripción de cada hnRNA que se asocia con una variedad de proteínas; hnRNP representa el sustrato para las reacciones de procesamiento que siguen. (11.7)

**Ribonucleoproteína pequeña nuclear** (SNO o RNP, *small, nucleolar ribonucleoproteins*). Partículas que se forman cuando los snoRNA se empacan con proteínas específicas; los snoRNP desempeñan un papel en la maduración y el ensamblaje de los RNA ribosómicos. (11.4)

**Ribozima.** Molécula de RNA que funciona como un catalizador en las reacciones celulares. (11.7)

**RNA de transferencia** (tRNA, *transfer RNA*). Familia de pequeños RNA que traducen la información codificada en el "alfabeto" nucleótido de un mRNA al "alfabeto" aminoácido de un polipéptido. (11.1)

**RNA mensajero** (mRNA, *messenger RNA*) La molécula intermedia entre un gen y el polipéptido para el que codifica. El RNA mensajero se ensambla como una copia complementaria de una de las dos hebras de DNA que codifica el gen. (11.1)

**RNA nuclear heterogéneo (hnRNA, *heterogeneous nuclear RNA*).** Gran grupo de moléculas de RNA que comparten las siguientes propiedades: 1) generan grandes pesos moleculares (hasta aproximadamente 80S, o 50 000 nucleótidos); 2) presentan muchas secuencias de nucleótidos diferentes; y 3) se encuentran sólo en el núcleo. Incluyen las pre-mRNA. (11.5)

**RNA polimerasa dependiente de DNA** (RNA polimerasas). Las enzimas responsables de la transcripción en células tanto procariotas como eucariotas. (11.2)

**RNA ribosómico (o rRNA).** RNA de un ribosoma. Los rRNA reconocen y unen otras moléculas, proporcionan soporte estructural y catalizan la reacción química en la que los aminoácidos se unen entre sí en forma covalente. (11.1)

**RNA nucleares pequeños** (snRNA, *small nuclear RNA*). RNA requeridos para el procesamiento de mRNA, pequeños (de 90 a 300 nucleótidos de longitud) y que funcionan en el núcleo. (11.7)

**Secuencia consenso.** La versión más común de una secuencia conservada. La secuencia TTGACA de un promotor bacteriano (conocido como el elemento –35) es un ejemplo de una secuencia consenso. (11.2)

**Secuencias intermedias.** Regiones de DNA que se encuentran entre las secuencias de codificación de un gen, y que por tanto, faltan en el mRNA correspondiente. (11.6)

**Silenciamiento de RNA.** Proceso en el cual RNA pequeños, no codificantes, por lo general derivados de precursores más largos de cadena doble, activan una inhibición específica de secuencia de la expresión génica. (11.10)

**Sitio A (aminoacil).** Sitio en el que los aminoacil-tRNA entran en el complejo ribosoma-mRNA. (11.16)

**Sitio E (salida).** Sitio de unión tRNA en el ribosoma que ocupa un tRNA después de que ha transferido su aminoácido a la cadena peptídica en crecimiento, pero antes de ser liberado del ribosoma. (11.16)

**Sitio P (peptidilo).** Sitio en el ribosoma desde el cual el tRNA dona aminoácidos a la cadena polipeptídica en crecimiento. (11.16)

**Sitios de empalme.** Extremos 5′ y 3′ de cada intrón. (11.7)

**snRNP.** Distintas partículas de ribonucleoproteína contenidas en los espliceosomas, llamadas así porque están compuestas de snRNA enlazados a proteínas específicas. (11.7)

**Tapa de metilguanosina.** Modificación del extremo 5′ de una molécula precursora de mRNA, de manera que la guanosina "invertida" terminal se encuentre metilada en la posición 7′ de su base de guanina, mientras que el nucleótido en el lado interno del puente de trifosfato está metilado en la posición 2′ de la ribosa. Esta tapa evita que las nucleasas digieran el extremo 5′ del mRNA, ayuda a transportar el mRNA fuera del núcleo, y desempeña un papel en el inicio de la traducción del mRNA. (11.7)

**Traducción.** Síntesis de proteínas en el citoplasma que utiliza la información codificada por un mRNA (11.1, 11.8)

**Transcripción.** Formación de un RNA complementario a partir de una plantilla de DNA. (11.1)

**Transcripción primaria** (o pre-RNA). Molécula de RNA inicial sintetizada a partir del DNA, que es equivalente en longitud al DNA del que se transcribió. Las transcripciones primarias suelen tener una existencia efímera y se procesan en RNA más pequeños y funcionales mediante una serie de reacciones de "cortar y pegar". (11.3)

**Transcriptoma.** El inventario completo de RNA transcritos por una célula, tejido u organismo en particular. (11.13)

**Translocación.** La etapa en la traducción durante la cual el ribosoma se mueve de un codón al siguiente. (11.17)

**Unidad de transcripción.** El segmento correspondiente de DNA en el que se transcribe una transcripción primaria. (11.3)

# Capítulo 12



**Aisladores.** Secuencias de límite especializadas que "acordonan" un promotor y su potenciador de otros elementos promotores/potenciadores. De acuerdo con un modelo, las secuencias aislantes se unen a las proteínas de la matriz nuclear. (12.15)

**Análisis de localización del genoma completo.** Método para mapear los sitios de unión de un factor de transcripción dado, aislando físicamente todas las secuencias de DNA en el genoma que están unidas a un factor particular y luego sondeando qué secuencias de DNA están presentes. (12.13)

**Cariotipo.** Imagen en la cual los cromosomas homólogos pareados se ordenan en tamaño decreciente. (12.5)

**Centrómero.** Marcada indentación en un cromosoma mitótico que sirve como sitio de la formación del cinetocoro. (12.5)

**Coactivadores.** Intermediarios que ayudan a los factores de transcripción unidos a estimular el inicio de la transcripción en el promotor nuclear. (12.15)

**Código de histonas.** Concepto de que el estado y la actividad de una región particular de la cromatina dependen de las modificaciones covalentes específicas, o combinación de modificaciones, a las colas de histonas de los nucleosomas en esa región. Las modificaciones son creadas por enzimas que acetilan, metilan y fosforilan varios residuos de aminoácidos en las histonas nucleares. (12.4)

**Complejo poro nuclear** (NPC, *nuclear pore complex*). Aparato complejo, similar a una cesta, que llena el poro nuclear como un tapón y se proyecta hacia afuera tanto en el citoplasma como en el nucleoplasma. (12.2)

**Complejos de remodelación de cromatina.** Complejos de proteínas de subunidades múltiples que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para alterar la estructura de la cromatina y permitir la unión de los factores de transcripción a los sitios reguladores en el DNA. (12.15)

**Control a nivel traduccional.** Determinación de si un mRNA en particular se traduce realmente y, en caso afirmativo, con qué frecuencia y en qué periodo. (12.9)

**Control a nivel transcripcional.** Determinación de si un gen en particular puede ser transcrito y, de ser así, con qué frecuencia. (12.9)

**Control de nivel postraduccional.** Regulación de la expresión genética después de la traducción, mediante el control de la actividad o la estabilidad de las proteínas. (12.9)

**Control de nivel de procesamiento.** Regulación de la vía por la cual una transcripción de RNA primario es procesada en un RNA mensajero que puede traducirse en un polipéptido. (12.9)

**Cromatina A.** Material complejo de nucleoproteínas que compone los cromosomas de las eucariotas. (12.2)

**Cuerpos P.** Gránulos citoplasmáticos en los que RNA se almacena o procesa para la degradación. (12.19)

**Duplicación.** Anomalía cromosómica en la que está presente una copia adicional de una porción de un cromosoma. (12.6)

**Deleción.** Aberración cromosómica que ocurre cuando falta una porción de un cromosoma. (12.6)

**Edición de RNA.** Cambios que se realizan en la secuencia de una molécula de RNA, después de su transcripción, que convierten un nucleótido en otro. (12.18)

**Elementos de respuesta.** Sitios en los que los factores de transcripción específicos se unen a las regiones reguladoras de un gen. (12.14)

**Eucromatina**. Cromatina que vuelve a su estado disperso durante la interfase. (12.4)

**Factores de transcripción.** Proteínas auxiliares (más allá de los polipéptidos que forman las RNA polimerasas) que se unen a los sitios específicos en el DNA y alteran la transcripción de genes cercanos. (12.11)

**Gen regulador.** Gen que codifica una proteína represora bacteriana. (12.1)

**Genes estructurales.** Genes que codifican moléculas de proteínas. (12.1)

**Heterocromatina.** Cromatina que permanece compactada durante la interfase. (12.4)

**Histona acetiltransferasas** (HAT, *histone acetyltransferases*). Enzimas que transfieren grupos acetilo a residuos de lisina y arginina de histonas nucleares. La acetilación de histonas se asocia con la activación de la transcripción. (12.15)

**Herencia epigenética.** Cambios hereditarios, es decir, cambios que pueden transmitirse de una célula a su progenie, que no implican cambios en la secuencia del DNA. Los cambios epigenéticos pueden ser el resultado de la metilación del DNA, la modificación covalente de las histonas y, probablemente, otros tipos de modificaciones de la cromatina. (12.7)

**Heterocromatina constitutiva.** Cromatina que permanece en estado compactado, en todas las células, en todo momento, y por tanto, representa el DNA que está permanentemente silenciado. Consiste sobre todo en secuencias altamente repetidas. (12.4)

**Heterocromatina facultativa.** Cromatina que ha sido específicamente inactivada durante ciertas fases de la vida de un organismo. (12.4)

**Histona desacetilasas** (HDAC, *histone deacetylases*). Enzimas que catalizan la eliminación de los grupos acetilo de las histonas nucleares. La desacetilación de la histona se asocia con la represión de la transcripción. (12.17)

**Histonas.** Colección de proteínas básicas de cromatina, pequeñas y bien definidas. (12.3)

**Huella de DNA.** Método para mapear sitios de unión del factor de transcripción, mediante la prueba de si el factor unido protege diferentes regiones de un gen de la digestión a través de enzimas de digestión de DNA. (12.13)

**Impresión.** Expresión diferencial de genes que dependen sólo de si el esperma o el óvulo contribuyeron al cigoto. (12.17)

**Inductor.** Compuesto que se une a un represor de proteínas y activa la transcripción de un operón bacteriano. (12.1)

**Inversión.** Aberración cromosómica que se produce después de que un cromosoma se rompe en dos lugares y el segmento central resultante se reincorpora al cromosoma en orden inverso. (12.6)

**Lámina nuclear.** Malla delgada compuesta de filamentos intermedios que recubre la superficie interna de la envoltura nuclear. (12.2)

**Mapeo de deleción.** Método para identificar regiones importantes para la regulación transcripcional, mediante el análisis de la expresión de construcciones artificiales de DNA, en las que faltan partes de la secuencia de DNA. (12.13)

**Micromatriz de DNA.** "Chips de DNA" preparados al detectar DNA de diferentes genes en una ubicación conocida u ordenada en un portaobjetos de vidrio. El portaobjetos se incuba luego con cDNA marcado con fluorescencia, cuyo nivel de hibridación proporciona una medida del nivel de expresión de cada gen en la matriz. (12.10)

**Nucleosomas.** Subunidades repetitivas de la cromatina. Cada nucleosoma contiene una partícula nuclear del nucleosoma, que consta de 146 pares de bases de DNA superenrollado envuelto casi dos veces alrededor de un complejo en forma de disco de ocho moléculas de histona. Las partículas del núcleo del nucleosoma

están conectadas entre sí por un tramo de DNA enlazador. (12.3)

**Operador**. Sitio de unión para represores bacterianos que está situado entre el sitio de unión de la polimerasa y el primer gen estructural. (12.1)

**Operón.** Complejo funcional en un cromosoma bacteriano que comprende un grupo de genes que incluyen genes estructurales, una región promotora, una región operadora y un gen regulador. (12.1)

**Operón inducible.** Operón en el que la presencia de la sustancia metabólica clave induce la transcripción de los genes estructurales. (12.1).

**Potenciador.** Sitio regulador en el DNA que puede estar ubicado a una distancia considerable, ya sea corriente arriba o corriente abajo del promotor que regula. La unión de uno o más factores transcripcionales al potenciador puede aumentar drásticamente la velocidad de transcripción del gen. (12.15)

**Proteína reguladora de genes.** Proteína que es capaz de reconocer una secuencia específica de pares de bases en el DNA y unirse a esa secuencia con alta afinidad por medio de la alteración de la expresión genética. (12.1)

**Promotor.** Sitio en el DNA al que se une la molécula de RNA polimerasa, antes de iniciar la transcripción. El promotor contiene información que determina cuál de las dos cadenas de DNA se transcribe y el sitio en el que comienza la transcripción. (12.1)

**Proteosoma.** Complejo de multiproteína en forma de barril, en el cual se degradan las proteínas citoplasmáticas. Las proteínas seleccionadas para la destrucción se unen a moléculas de ubiquitina y se enhebran a la cámara central del proteosoma. (12.21)

**Ran.** Proteína de unión a GTP que existe en una forma activa unida a GTP o una forma inactiva unida a GDP. Ran regula el transporte nucleocitoplasmático. (12.2)

**Regiones no traducidas** (UTR, *untranslated regions*). Segmentos no codificadores contenidos en los extremos 5′ y 3′ de los mRNA. (12.19)

**Represor.** Proteína reguladora del gen que se une al DNA e inhibe la transcripción. (12.1)

**Riboswitches.** Secuencias dentro del mRNA que, una vez unidas a un metabolito, experimentan un cambio en su conformación plegada que les permite alterar la expresión de un gen involucrado en la producción de ese metabolito. La mayoría de los riboswitches suprimen la expresión genética, al bloquear la terminación de la transcripción o la iniciación de la traducción. (12.1)

**Secuenciación de RNA.** Análisis de patrones de expresión genética mediante la determinación de la secuencia de RNA aislado de una célula, lo que permite determinar el número de transcripciones para cada gen en el genoma. (12.10)

**Señal de localización nuclear** (NLS, *nuclear localization signal*). Secuencia de aminoácidos en una proteína que es reconocida por un receptor de transporte que conduce a la translocación de la proteína del citoplasma al núcleo. (12.2)

**Telómero.** Tramo inusual de secuencias de DNA repetidas, que forma un "casquete" en cada extremo de un cromosoma. (12.5)

**Telomerasa.** Nueva enzima que puede agregar nuevas unidades repetitivas de DNA al extremo 3′ de la cadena que sobresale de un telómero. La telomerasa es una transcriptasa inversa que sintetiza DNA utilizando una plantilla de RNA. (12.5)

**Translocación.** Aberración cromosómica que resulta cuando todo o parte de un cromosoma se une a otro cromosoma. (12.6)

**Ubiquitina.** Proteína pequeña, altamente conservada, que se une a proteínas dirigidas a la internalización por endocitosis o degradación en los proteosomas. (12.21)

## Capítulo 13



**Abrazadera β.** Uno de los componentes no catalíticos del replisoma que rodea el DNA y mantiene la polimerasa asociada con el molde del DNA. (13.4)

**DNA girasa.** Topoisomerasa tipo II que puede cambiar el estado de superenrollado en una molécula del DNA, al aliviar la tensión que se acumula durante la replicación. Lo realiza viajando a lo largo del DNA, al actuar como "pivote" y cambiar el DNA superenrollado de forma positiva en DNA superenrollado de manera negativa. (13.2)

**DNA ligasa.** Enzima responsable de unir fragmentos de DNA en una cadena continua. (13.2)

**DNA polimerasas.** Enzimas responsables de construir nuevas hebras de DNA durante la replicación o la reparación del DNA. (13.2)

**Focos de replicación.** Localización de las horquillas de replicación activas en el núcleo de la célula. Existen aproximadamente de 50 a 250 focos, cada uno de los cuales contiene alrededor de 40 horquillas de replicación que incorporan nucleótidos en hebras de DNA de forma simultánea. (13.6)

**Fragmentos de Okazaki.** Pequeños segmentos de DNA que se unen rápidamente a piezas más largas, que han sido sintetizadas previamente para formar la hebra retrasada. (13.2)

**Hebra adelantada.** Hebra de DNA hija recién sintetizada que se sintetiza de forma continua, así denominada porque su síntesis continúa a medida que avanza la horquilla de replicación. (13.2)

**Hebra retrasada.** Nueva hebra de DNA hija recién sintetizada que se sintetiza de forma discontinua, así llamada porque la iniciación de cada fragmento debe esperar a que las hebras parentales se separen y expongan el molde adicional. (13.2)

**Helicasa.** Proteína que desenrolla del DNA dúplex (o RNA) en una reacción en la que la energía liberada por la hidrólisis del ATP se utiliza para romper los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras. (13.3)

**Horquillas de replicación.** Puntos en los que el par de segmentos del DNA replicados se juntan y se unen a los segmentos no replicados. Cada horquilla de replicación corresponde a un sitio donde 1) la doble hélice parental está experimentando la separación de la hebra, y 2) los nucleótidos se están incorporando a las hebras complementarias recién sintetizadas. (13.2)

**Inicio de la replicación.** Primer paso de la replicación del DNA en el que la DNA polimerasa se carga en el DNA y las cadenas de DNA se separan para permitir que la polimerasa comience a copiar el DNA. (13.2)

**Mutaciones sensibles a la temperatura** (ts, *temperature-sensitive*). Mutaciones que sólo se expresan de manera fenotípica cuando las células (u organismo) crecen a una temperatura más alta (restrictiva). A la temperatura más baja (permisiva), la proteína codificada puede mantenerse unida lo suficientemente bien para realizar su actividad, lo que da lugar a un fenotipo relativamente normal. Por lo general, las mutaciones "ts" son útiles para estudiar actividades requeridas tales como la secreción y la replicación, debido a que las mutaciones "normales" que afectan a estos procesos son con frecuencia letales. (13.2)

**Origen de replicación.** Sitio específico en el cromosoma bacteriano donde comienza la replicación. (13.2)

**Plantilla.** Una cadena simple del DNA (o RNA) que contiene la información (codificada como una secuencia de nucleótidos) para la construcción de una hebra complementaria. (13.2)

**Primario.** Cadena de DNA o RNA que proporciona la DNA polimerasa con el terminal 3′OH necesario. (13.2)

**Primasa.** Tipo de RNA polimerasa que ensambla los primarios cortos de RNA que comienzan la síntesis de cada fragmento de Okazaki de la cadena retrasada. (13.2)

**Proteínas ligantes de DNA de cadena simple** (o SSB, *single-stranded DNA-binding*). Proteínas que facilitan la separación de las hebras del DNA mediante su unión a hebras de DNA simples y desnudas, que las mantiene en un estado extendido y evita que se vuelvan a enrollar. (13.3)

**Reparación de mal emparejamiento** (MMR, *mismatch repair*). Sistema de reparación del DNA que elimina las bases mal emparejadas que son incorporadas por la DNA polimerasa y escapan a la exonucleasa de corrección de la enzima. (13.8)

**Reparación por escisión de bases** (BER, *base excision repair*). Un mecanismo de corte y parche para la eliminación de nucleótidos alterados del DNA, por ejemplo, el uracilo (formado a partir de la citosina) y 8-oxoguanina. (13.8)

**Reparación por escisión de nucleótidos** (NER, *nucleotide excision repair*). Mecanismo de corte y parche para la eliminación del DNA de una variedad de lesiones voluminosas, por ejemplo, los dímeros de pirimidina, causadas por la radiación ultravioleta. (13.8)

**Replicación del DNA.** Proceso mediante el cual se copia el DNA de una célula antes de la división celular. (13.1)

**Replicación semiconservativa.** Replicación en la que cada célula hija recibe una cadena de la hélice del DNA parental. (13.1)

**Roturas de la doble hebra** (DSB, *double-strand breaks*). Daños al DNA a menudo resultantes de la radiación ionizante que implica una fractura de ambas hebras de la doble hélice. Las DSB pueden ser debilitantes para una célula y al menos dos sistemas de reparación distintos están dedicados a su reparación. (13.8)

## Capítulo 14

**Anafase A**. Movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la mitosis. (14.10)

**Anafase B**. Elongación del huso mitótico, que hace que los dos polos del huso se separen. (14.10)

**Anafase.** Etapa de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas se separan entre sí. (14.10)

**Áster.** Disposición en "estallido" de microtúbulos alrededor de cada centrosoma durante la mitosis. (14.7)

**Bivalente (tétrada).** Complejo formado durante la meiosis por un par de cromosomas homólogos que forman sinapsis. (14.13)

**Centrosoma.** Estructura compleja que contiene dos centriolos en forma de barril, rodeados por *material pericentriolar* (PCM, *pericentriolar material*) amorfo y electrodenso, donde se nuclean los microtúbulos. (14.7)

**Ciclo celular.** Las etapas a través de las cuales una célula pasa de una división celular a la siguiente. (14.1)

**Cinasas dependientes de ciclinas** (Cdks, *cyclin-dependent kinases*)**.** Enzimas que controlan la progresión de las células a través del ciclo celular. (14.4)

**Cinetocoro.** Una estructura en forma de botón, situada en la superficie externa del centrómero, a la cual se adjuntan los microtúbulos del huso. (14.7)

**Citocinesis.** La parte del ciclo celular durante la cual ocurre la división física de la célula en dos células hijas. (14.1)

**Cohesina.** Un complejo multiproteico que mantiene las cromátidas replicadas asociadas entre sí, hasta que se separan durante la división celular. (14.7)

**Compactación cromosómica.** (condensación cromosómica) Proceso en el que una célula convierte sus cromosomas en una estructura más corta y gruesa que se puede segregar durante la mitosis o la meiosis. (14.7)

**Complejo sinaptonémico** (SC, *synaptonemal complex*). Estructura en forma de escalera compuesta por tres barras paralelas con muchas fibras cruzadas. El SC mantiene cada par de cromosomas homólogos en la posición adecuada para permitir la continuación de la recombinación genética entre las hebras de DNA. (14.13)

**Congresión.** El movimiento de cromosomas duplicados hacia la placa metafásica durante la prometafase de la mitosis. (14.8)

**Cromátida.** Miembros pareados y con forma cilíndrica de cromosomas mitóticos que representan los cromosomas duplicados formados durante la replicación en la interfase previa. (14.7)

**División celular asimétrica.** División celular que produce dos células hijas no idénticas. (14.1)

**División celular.** El proceso por el cual nuevas células se originan de otras células vivas. (14.1)

**Esporofito.** Una etapa diploide del ciclo de vida de las plantas que comienza con la unión de dos gametos para formar un cigoto. Durante la etapa de esporofito ocurre la meiosis, produciendo esporas que germinan directamente en un gametofito haploide. (14.12)

**Fase M.** La parte del ciclo celular que incluye los procesos de mitosis —durante el cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos—, y la citocinesis, durante la cual toda la célula se divide físicamente en dos células hijas. (14.1)

**Fase S.** La fase del ciclo celular en el que se produce la replicación. (14.1)

**Fragmoplasto.** Material denso, más o menos alineado en la placa metafásica previa del plano ecuatorial de las células vegetales, que consiste en grupos de microtúbulos interdigitantes orientados de manera perpendicular a la futura placa celular, junto con vesículas y material asociado denso en electrones. (14.11)

**Gametofito.** La etapa haploide del ciclo de vida de las plantas, que comienza con las esporas generadas durante la etapa de esporofito. Durante la etapa de gametofito, los gametos se forman a través del proceso de mitosis. (14.12)

**Huso mitótico.** "Máquina" que contiene microtúbulos y funciona en la organización y clasificación de los cromosomas duplicados durante la división celular mitótica. (14.7)

**Interfase.** La parte del ciclo celular entre los períodos de división celular. (14.1)

**Meiosis.** Proceso durante el cual se reduce el número de cromosomas, de manera que las células que se formen sólo contengan un miembro de cada par de cromosomas homólogos. (14.12)

**Metafase.** Etapa de la mitosis durante la cual todos los cromosomas se han alineado en el ecuador del huso, con una cromátida de cada cromosoma conectada a un polo y su cromátida hermana conectada al polo opuesto. (14.9)

**Mitosis.** Proceso de división nuclear en el cual los cromosomas duplicados están separados de forma precisa unos de otros produciendo dos núcleos, cada uno con una copia completa de todos los cromosomas presentes en la célula original. (14.1)

**Placa celular.** Estructura entre el citoplasma de dos células hijas recién formadas que da lugar a una nueva pared celular en las células vegetales. (14.11)

**Profase.** La primera etapa de la mitosis, durante la cual los cromosomas duplicados se preparan para la segregación y se ensambla la maquinaria mitótica. (14.7)

**Prometafase.** La fase de la mitosis durante la cual se forma el huso mitótico definitivo y los cromosomas se mueven a su posición en el centro de la célula. (14.8)

**Punto de control del ensamblaje del huso** (SAC, *spindle assembly checkpoint*). Un punto de control que opera en la transición entre metafase y anafase; el punto de control del huso se revela mejor cuando un cromosoma no se alinea correctamente en la placa metafásica. (14.10)

**Puntos de control.** Mecanismo que detiene el progreso del ciclo celular si 1) se daña alguno de los DNA cromosómicos, o 2) ciertos procesos críticos, como la replicación del DNA o la alineación cromosómica durante la mitosis, no se han completado correctamente. (14.5)

**Quiasmas.** Puntos específicos de unión entre cromosomas homólogos de bivalentes, observados mientras los cromosomas homólogos se separan en el comienzo de la etapa diploteno de la profase meiótica. Los quiasmas se encuentran en los sitios de los cromosomas durante el intercambio de segmentos cromosómicos que se había producido con anterioridad. (14.13)

**Sinapsis.** El proceso por el cual los cromosomas homólogos se unen entre sí durante la meiosis. (14.13)

**Telofase.** La etapa final de la mitosis donde las células hijas vuelven a la condición de interfase: el huso mitótico se desmonta, la envoltura nuclear se reforma y los cromosomas se dispersan cada vez más hasta desaparecer de la vista bajo el microscopio. (14.11)

# Capítulo 15



**Apoptosis.** Un tipo de muerte celular ordenada o programada, en la que la célula responde a ciertas señales al iniciar una respuesta normal, lo que conduce a su muerte. La muerte por apoptosis se caracteriza por la compactación total de la célula y su núcleo, la disección ordenada de la cromatina en piezas por las manos de una endonucleasa especial que divide el DNA, y el rápido englobamiento de la célula moribunda por fagocitosis. (15.17)

**Calmodulina.** Una pequeña proteína de unión al calcio que está ampliamente distribuida. Cada molécula de la calmodulina contiene cuatro sitios de unión al calcio. (15.14)

**Cascada de Ras-MAP cinasa.** Una cascada que se activa en respuesta a una amplia variedad de señales extracelulares y desempeña una función clave en la regulación de actividades vitales como la proliferación y diferenciación celular. (15.11)

**Caspasas.** Una familia de proteasas cisteínas que se activan en una etapa temprana de apoptosis y son responsables de los eventos degradativos observados durante la muerte celular. (15.17)

**Dominio PH.** Un dominio de proteína que se une a los anillos de inositol fosforilado de los fosfoinosítidos unidos a la membrana. (15.6)

**Efector.** Una sustancia que produce una respuesta celular a una señal. (15.1)

**Fosfoinosítidos.** Incluye una cantidad de derivados del fosfatidilinositol fosforilado (p. ej., $PIP_1$, $PIP_2$ y $PIP_3$), los cuales funcionan como segundos mensajeros en las vías de señalización. (15.6)

**Ligando.** Cualquier molécula que pueda unirse a un receptor porque tiene una estructura complementaria. (15.1)

**Moléculas mensajeras extracelulares.** Los medios por los cuales las células generalmente se comunican entre sí. Los mensajeros extracelulares pueden viajar una distancia corta y estimular a las células que están muy cerca del origen del mensaje, o pueden viajar por todo el cuerpo, estimulando potencialmente las células que están lejos de la fuente. (15.1)

**Proteína tirosina cinasa receptora** (o RTK, *receptor-protein tyrosine kinases*). Receptor de la superficie celular que, siguiendo la unión de un ligando, puede fosforilar los residuos de tirosina en sí mismos y/o en los sustratos citoplásmicos. Está involucrado principalmente en el control del crecimiento y la diferenciación celulares. (15.10)

**Proteínas tirosina cinasas.** Enzimas que fosforilan residuos específicos de tirosina de otras proteínas. (15.10)

**Proteínas de unión a GTP (o proteínas G).** Con funciones reguladoras clave en muchos procesos celulares diferentes, las proteínas G pueden estar presentes en al menos dos conformaciones alternativas: una forma activa que contiene una molécula de GTP unida, y una forma inactiva, la cual consta de una molécula de GDP unida. (15.2)

**Proteínas que se unen al calcio.** Proteínas, como la calmodulina, que se unen al calcio y le permiten provocar una variedad de respuestas celulares. (15.14)

**Proteína-tirosina cinasas no receptoras.** Cinasas citoplásmicas que fosforilan residuos de tirosina específicos de proteínas seleccionadas. (15.10)

**Receptor.** Cualquier sustancia que pueda unirse a una molécula específica (ligando), lo cual a menudo conduce a la captación o transducción de señal. (15.1)

**Receptores acoplados a proteína G** (GPCR, *G protein-coupled receptors*). Un grupo de receptores relacionados que abarcan siete veces la membrana plasmática. La unión del ligando a su receptor específico causa un cambio en la conformación del receptor, lo que aumenta su afinidad por una proteína G heterotrimérica iniciando así una respuesta dentro la célula. (15.3)

**Segundo mensajero.** Una sustancia que se forma en la celda como resultado de la unión de un primer mensajero —una hormona u otro ligando— a un receptor en la superficie externa de la célula. (15.1)

**Señalización celular.** Comunicación en la que la información se transmite a través de la membrana plasmática al interior de la célula y, con frecuencia, al núcleo celular por medio de una serie de interacciones moleculares. (15.1)

**Sustratos del receptor de insulina** (IRS, *insulin receptor substrates*). Sustratos de proteína que, cuando se fosforilan en respuesta a la insulina, unen y activan una variedad de efectores "corriente abajo". (15.12)

**Transducción de señal.** El proceso general en el cual la información, que se transporta por las moléculas mensajeras extracelulares, se traduce en cambios que ocurren en el interior de una célula. (15.1)

**Vías de señalización.** La información de las superautopistas de la célula. Cada una consiste en una serie de proteínas distintas, las cuales operan en secuencia. Cada proteína en la vía actúa alterando la conformación de la proteína corriente abajo en las series. (15.1)

## Capítulo 16

**Células madre del cáncer.** Células que se cree que existen en algunos tumores que son responsables de mantener el tumor y permitir que se propague. (16.17)

**Genes supresores de tumores.** Genes que codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y evitan que las células se vuelvan malignas. (16.5)

**Oncogenes.** Genes que codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de la célula a un estado maligno. Estos genes tienen la capacidad de transformar células. (16.5)

**Protooncogenes.** Variedad de genes que tienen el potencial de subvertir las actividades de la célula y empujar la célula hacia el estado maligno. Los protooncogenes codifican proteínas que tienen varias funciones en las actividades normales de una célula. Los protooncogenes se pueden convertir en oncogenes. (16.5)

**Virus tumorales de DNA.** Virus capaces de infectar células de vertebrados, transformándolas en células cancerosas. Los virus de DNA tienen DNA en la partícula de virus maduros. (16.2)

**Virus tumorales de RNA.** Retrovirus capaces de infectar células de vertebrados y transformarlas en células cancerosas. Los virus de RNA tienen RNA en la partícula de virus maduros. (16.2)

# Capítulo 17



**Anticuerpo.** Proteína inmunoglobulina producida por células plasmáticas derivadas de linfocitos B que interactúa con la superficie de un patógeno o sustancia extraña para facilitar su destrucción. (17.1)

**Autoanticuerpos.** Anticuerpos capaces de reaccionar con los tejidos propios del cuerpo. (17.2)

**Artritis reumatoide.** Una condición causada por la destrucción progresiva del tejido de las articulaciones por una cascada de respuestas autoinmunes inflamatorias. (17.3)

**Antígeno.** Cualquier sustancia reconocida por el sistema inmune como extraña para el organismo (17.2)

**Cadena ligera.** El más pequeño de los dos tipos de cadenas polipéptidas en un anticuerpo, con una masa molecular de *23K Da).* (17.7)

**Cadena pesada.** Uno de los dos tipos de cadenas polipeptídicas en un anticuerpo, usualmente con una masa molecular de 50 a 70KD. (17.7)

**Célula asesina natural (NK).** Un tipo de linfocito que se compromete en un ataque no específico en una célula hospedera no infectada, conduciendo a la apoptosis. (17.1)

**Células dendríticas (DC).** Células presentadoras de antígenos que interactúan con células T y B para activar una respuesta inmune. (17.6)

**Células plasmáticas.** Células diferenciadas terminalmente que se desarrollan de linfocitos B que sintetizan y segregan grandes cantidades de anticuerpos formados en la sangre. (17.2)

**Células presentadoras de antígenos (APC).** Células que presentan porciones de antígenos de proteínas en su superficie. Las porciones son obtenidas por proteólisis de antígenos grandes. Los péptidos antiantígenos son exhibidos en conjunción con moléculas MHC. Virtualmente cualquier célula en el cuerpo puede funcionar como una APC por presentación de péptidos en combinación con moléculas MHC clase I, que provee un mecanismo para la destrucción de células infectadas. En contraste, los macrófagos, las células dentríticas, y las células B son llamadas APC "profesionales" debido a que tienen la función de ingerir materiales, procesarlos y presentarlos a las células $T_H$ en combinación con las moléculas MHC clase II. (17.6)

**Citocinas.** Proteínas secretadas por células del sistema inmune que alteran el comportamiento de otras células inmunes. (17.6)

**Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).** Una región del genoma que codifica las **proteínas MHC**. Los genes que codifican estas proteínas tienden a ser altamente polimórficos, siendo representadas por un gran número de alelos diferentes. Estas diferencias genéticas entre humanos explican la tendencia de un individuo a rechazar el trasplante de otro individuo que no sea un gemelo idéntico. (17.10)

**Complemento.** Un sistema de proteínas plasmáticas en sangre que actúa como parte del sistema inmune innato para destruir microorganismos invasores ya sea directamente (a través de poros de la membrana plasmática) o indirectamente (haciéndolos susceptibles a fagocitosis) (17.1).

**Diabetes tipo 1.** Trastorno autoinmune que trae como resultado la destrucción de las células b secretoras de insulina en el páncreas. (17.3)

**Enfermedad de Graves.** Enfermedad autoinmune de la tiroides, causada por producción de anticuerpos que se unen al receptor de la hormona estimuladora de la tiroides, conduciendo a estimulación e hipertiroidismo. (17.3)

**Enfermedades autoinmunes.** Enfermedades caracterizadas por un ataque del sistema autoinmune contra los tejidos propios del cuerpo. Incluye esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina y artritis reumatoide. (17.3)

**Enfermedades inflamatorias intestinales (IBD).** (17.3)

**Epítopo (o determinante antigénico).** Porción de un antígeno que se une al sitio de combinación al antígeno de un anticuerpo específico. (17.7)

**Esclerosis múltiple**. Enfermedad autoinmune causada por la destrucción de la envoltura de mielina que rodea los axones de las neuronas. (17.3)

**Inmunidad humoral.** Inmunidad mediada por anticuerpos formados en la sangre. (17.1)

**Inmunidad mediada por célula.** Llevada a cabo por linfocitos T, que cuando son activados, puede reconocer específicamente y matar una célula infectada (o extraña). (17.1)

**Inflamación.** Acumulación localizada de fluido y leucocitos en respuesta a lesión o infección, que conduce a enrojecimiento, hinchazón y fiebre. (17.1)

**Inmunidad.** Estado en el cual el cuerpo no es susceptible de contraer una infección por un patógeno particular. (17.1)

**Linfocitos.** Leucocitos nucleados (glóbulos blancos) que circulan entre la sangre y los órganos linfáticos que median en la inmunidad adquirida. Incluye tanto células B como células T. (17.1)

**Linfocitos B (o células B).** Linfocitos que responden a antígenos por proliferación y diferenciación en las células plasmáticas que secretan anticuerpos nacidos en la sangre. Estas células alcanzan su estado diferenciado en la médula ósea. (17.1)

**Linfocitos T (o células T).** Linfocitos que responden a antígeno por proliferación y diferenciación en CTL (linfocitos citotóxicos) que atacan y matan células infectadas o células TH que son r equeridas para la producción de anticuerpos por células B. Estas células obtienen su estado diferenciado en el timo. (17.1)

**Lupus eritematoso sistémico (SLE).** Trastorno autoinmune donde los anticuerpos son producidos contra varios antígenos nucleares, dando como resultado daño de los diversos tejidos del cuerpo. (17.3)

**Proteínas MHC.** Proteínas codificadas por la región MHC del genoma que se une a antígenos procesados (péptidos antigénicos) y los presentan en la superficie de la célula. Divididas en dos clases principales, las moléculas *MHC clase I*, producidas virtualmente por todas las células del cuerpo, y las moléculas *MHC clase II* por APC "profesionales", tales como macrófagos y células dendríticas. (17.10)

**Receptores similares a Toll (TLR).** Un tipo de receptor patógeno del sistema inmune innato. Los humanos expresan al menos 10 TLR funcionales, todos los cuales son proteínas transmembranas presentes en las superficies de muchos tipos de células diferentes. (17.1)

**Receptor de célula T (TCR).** Proteínas presentes en la superficie de los linfocitos T que median en la interacción con antígenos de unión a células específicas. Como la inmunoglobulina de células B, estas proteínas están formadas por un proceso de reordenamiento de DNA que genera un sitio de combinación al antígeno. Los TCR consisten de dos subunidades, cada una contiene tanto el dominio variable como el dominio constante. (17.6)

**Respuesta immune adaptativa.** Respuesta específica a un patógeno que requiere exposición previa a ese agente. Incluye respuestas mediadas por anticuerpos y linfocitos T. (17.1)

**Respuesta inmune innata.** Una respuesta no específica a un patógeno que no requiere

exposición previa al antígeno, incluye respuestas mediadas por células NK, complemento, fagocitos e interferón. (17.1)

**Respuestas inmunes.** Respuestas provocadas por células del sistema inmune al ponerse en contacto con materiales extraños, incluyendo patógenos invasores. Incluye respuestas innatas y adaptativas. Las respuestas innatas adaptativas pueden ser divididas en respuestas primarias que siguen a la exposición inicial a un antígeno y respuestas secundarias que siguen a la reexposición a ese antígeno. (17.1)

**Sistema inmune.** Sistema fisiológico consistente en órganos, tejidos dispersos, y células independientes que protegen el cuerpo de patógenos invasores y materiales extraños. (17.1)

**Superfamilia de inmunoglobulina(IgSF).** Una amplia variedad de proteínas que contienen dominios compuestos de 70 a 110 aminoácidos que son homólogos de dominios que constituyen las cadenas de polipéptidos de anticuerpos formados en la sangre. (17.1)

**Teoría de la selección clonal.** Teoría que postula que los linfocitos B y T desarrollan su habilidad para producir anticuerpos específicos o receptores de células T previos a la exposición al antígeno. Por tanto, cuando un antígeno entra en el cuerpo, debe interacturar específicamente con aquellos linfocitos B y T que sostienen receptores complementarios. La interacción entre el antígeno y los linfocitos B o T conduce a la proliferación de linfocitos para formar un clon de células capaces de responder a ese antígeno específico. (17.2)

**Tiroiditis.** Una enfermedad que se desarrolla de un ataque inmune contra una o más proteínas tiroideas, lo que conduce a la destrucción de la glándula tiroidea y el hipotiroidismo. (17.3)

# Capítulo 18



**Actividad específica.** La relación entre la cantidad de una proteína de interés y la cantidad total de proteína presente en una muestra, que se utiliza como medida de purificación. (18.11)

**Animales transgénicos.** Animales que han sido diseñados genéticamente para que sus cromosomas contengan genes extraños. (18.24)

**Anticuerpo monoclonal.** Una preparación de moléculas de anticuerpos producida a partir de una colonia única (o clon) de células. (18.26)

**Antisuero.** Fluido que contiene los anticuerpos deseados que permanecen después de la eliminación de las células y los factores de la coagulación de la sangre completa que ha sido expuesta a un antígeno dado. (18.26)

**Artefacto.** Una estructura vista en una imagen microscópica que resulta de la coagulación o precipitación de materiales que no tenían existencia en la célula viva. (18.5)

**Autorradiografía.** Una técnica para visualizar procesos bioquímicos al permitir que un investigador determine la ubicación de los materiales marcados radiactivamente dentro de una célula. Las secciones de tejido que contienen isótopos radiactivos se cubren con una capa delgada de emulsión fotográfica, que se expone por la radiación que emana del tejido. Los sitios en las células que contienen radiactividad se revelan bajo el microscopio por los granos de plata después del desarrollo de la emulsión suprayacente. (18.8)

**Bibliotecas de DNA.** Colecciones de fragmentos de DNA clonados. Las bibliotecas normalmente se dividen en genómicas y bibliotecas de cDNA. (18.23)

**Células madre embrionarias** (ES, *embryonic stem*). Un tipo de célula que tiene virtualmente poderes ilimitados de diferenciación, que se encuentra en el blastocisto de los mamíferos, una etapa temprana del desarrollo embrionario comparable a la blástula de otros animales. (18.25)

**Centrifugación diferencial.** Una técnica utilizada para aislar un orgánulo particular en grandes cantidades, que depende del principio de que, mientras sean más densos que el medio circundante, las partículas de diferente tamaño y forma viajan hacia el fondo de un tubo de centrífuga a diferentes velocidades cuando se coloca en un campo centrífugo. (18.10)

**Clonación de DNA.** Una técnica para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico, que generalmente implica el empalme del segmento en un vector de DNA y permite que el vector se replique dentro de una célula huésped bacteriana. (18.20)

**Contraste.** La diferencia de aspecto entre las partes adyacentes de un objeto o un objeto y su fondo. (18.1)

**Cromatografía.** Un término utilizado para una amplia variedad de técnicas en las que una mezcla de componentes disueltos se fracciona a medida que se mueve a través de algún tipo de matriz inmóvil. (18.11)

**Cromatografía de afinidad.** Técnica de purificación de proteínas que utiliza las propiedades estructurales —únicas de una proteína— que permiten que la molécula se extraiga específicamente de la solución, en la que permanecen las demás moléculas. La solución se pasa a través de una columna en la que se inmoviliza una molécula interactiva específica (como un sustrato, ligando o antígeno) mediante un enlace a un material inerte (la matriz). (18.11)

**Cristalografía de rayos X (o difracción de rayos X).** Una técnica que bombardea cristales de proteínas con un haz delgado de rayos X de una sola longitud de onda (monocromática). La radiación que es difractada por los electrones de los átomos de la proteína golpea una placa fotográfica o un sensor. El patrón de difracción producido por el cristal está determinado por la estructura dentro de la proteína. (18.16)

**Cromosoma artificial bacteriano** (BAC, *bacterial artificial chromosome).* Vector de clonación capaz de aceptar grandes fragmentos de DNA extraño que pueden clonarse en las bacterias. Consiste en un plásmido F con un origen de replicación y los genes necesarios para regular la replicación. Los BAC han desempeñado un papel clave en la secuenciación del genoma. (18.23)

**Cromosomas artificiales de levadura** (YAC). Elementos de clonación que son versiones artificiales de un cromosoma de levadura normal. Contienen todos los elementos de un cromosoma de levadura que son necesarios para que la estructura se replique durante la fase S y se segreguen las células hijas durante la mitosis, más un gen cuyo producto codificado permite seleccionar aquellas células que contienen el YAC de aquellas que carecen del elemento y el fragmento de DNA a ser clonado. (18.23)

**Cromatografía de intercambio iónico.** Una técnica para la purificación de proteínas en la que se utiliza la carga iónica para separar proteínas diferentes. (18.11)

**Cultivo celular.** La técnica utilizada para el crecimiento de las células fuera del organismo. (18.9)

**Cultivo primario.** Cultivo de células obtenidas directamente del organismo. (18.9)

**Cultivo secundario.** Transferencia de células previamente cultivadas a un medio de cultivo. (18.9)

**DNA recombinante.** Moléculas que contienen secuencias de DNA derivadas de más de una fuente. (18.20)

**Electroforesis.** Técnicas de fraccionamiento que dependen de la capacidad de las moléculas cargadas para migrar cuando se colocan en un campo eléctrico. (18.13)

**Electroforesis en gel de poliacrilamida** (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*). Técnica de fraccionamiento de proteínas en la que las proteínas son impulsadas por una corriente aplicada a través de un gel compuesto por una pequeña molécula orgánica (acrilamida) que está reticulada para formar un tamiz molecular. (18.13)

**Endonucleasas de restricción (o enzimas de restricción).** Nucleasas contenidas en las bacterias que reconocen secuencias cortas de nucleótidos dentro del DNA dúplex y escinden el esqueleto en sitios altamente específicos en ambas cadenas del dúplex. (18.20)

**Ensayo.** Alguna característica identificable de una proteína específica, como la actividad catalítica de una enzima, utilizada para determinar la cantidad relativa de esa proteína en una muestra. (18.11)

**Espectrofotómetro.** Instrumento utilizado para medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica que es absorbida por una solución. Si uno conoce las características de absorbancia de un tipo particular de molécula, entonces la cantidad de luz de la longitud de onda apropiada absorbida por una solución de esa molécula proporciona una medida sensible de su concentración. (18.14)

**Fijador.** Una solución química que destruye las células al penetrar rápidamente la membrana celular e inmovilizar todo su material macromolecular de tal manera que la estructura de la célula se mantiene lo más cerca posible de la del estado vivo. (18.2)

**Filtración en gel.** Técnica de purificación en la que la separación de las proteínas (o ácidos nucleicos) se basa principalmente en la masa molecular. El material de separación consiste en pequeñas perlas porosas que se empaquetan en una columna a través de la cual la solución de proteína pasa lentamente. (18.11)

**Grabado por congelación.** Técnica en la que el tejido se fractura por congelación y luego se expone brevemente al vacío para que una capa delgada de hielo pueda evaporarse desde arriba y debajo de las superficies fracturadas, lo que expone las

características para su identificación mediante microscopía electrónica. (18.5)

**Hibridación de ácidos nucleicos.** Una variedad de técnicas relacionadas que se basan en el hecho de que dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias de secuencia de base complementaria formarán un híbrido bicatenario. (18.18)

**Hibridomas.** Células híbridas producidas por la fusión de un linfocito normal productor de anticuerpos y una célula de mieloma maligno. Los hibridomas proliferan y producen grandes cantidades de un único anticuerpo (monoclonal) que la célula normal estaba sintetizando antes de la fusión con la célula del mieloma. (18.26)

**Inmunofluorescencia directa.** Técnica para la localización intracelular de un antígeno, en el que los anticuerpos se conjugan con pequeñas moléculas fluorescentes para formar derivados que luego se incuban con las células o secciones de las células. Los sitios de unión se visualizan entonces con el microscopio de fluorescencia. (18.26)

**Inmunofluorescencia indirecta.** Una variación de la inmunofluorescencia directa en la que las células se tratan con un anticuerpo no marcado, que permite formar un complejo con el antígeno correspondiente. La ubicación de la pareja antígeno-anticuerpo se revela luego en un segundo paso utilizando una preparación de anticuerpos marcados con fluorescencia cuyos sitios de combinación se dirigen contra las moléculas de anticuerpo utilizadas en el primer paso. (18.26)

**Límite de resolución.** La resolución que puede alcanzar un microscopio está limitada por la longitud de onda de la iluminación según la ecuación $D = 0.6\ \lambda/n$ sen $\alpha$, donde D es la distancia mínima a la que deben separarse dos puntos en la muestra para su resolución, $\lambda$ es la longitud de onda de la luz, y $n$ es el índice de refracción del medio. Alfa es una medida de la capacidad de recolección de la luz por la lente y está directamente relacionada con su abertura. Para un microscopio óptico, el límite de resolución es ligeramente menor que 200 nm. (18.1)

**Línea celular.** Células que se usan con frecuencia en estudios de cultivo de tejidos que han sufrido modificaciones genéticas, las cuales les permiten crecer indefinidamente. (18.9)

**Lente objetivo.** La lente de un microscopio óptico que enfoca los rayos de luz de la muestra para formar una imagen real y ampliada del objeto dentro de la columna del microscopio. (18.1)

**Microscopio de campo brillante.** Un microscopio en el que la luz de la fuente de iluminación converge en la muestra por medio del condensador, situado debajo de la platina, formando así un cono de luz brillante que puede entrar en lente objetivo. (18.2)

**Microscopio de contraste de fase.** Un microscopio que convierte las diferencias en el índice de refracción en diferencias de intensidad (brillo relativo y oscuridad), que luego son visibles para el ojo, lo que hace que los objetos altamente transparentes sean más visibles. (18.2)

**Microscopio de escaneo confocal.** Un microscopio en el que la muestra está iluminada por un rayo láser finamente enfocado que escanea de forma rápida a través de la muestra a una sola profundidad, por lo que ilumina sólo un plano delgado (o "sección óptica") dentro del objeto. El microscopio se usa con muestras teñidas con fluorescencia, y la luz emitida desde la sección óptica iluminada se usa para formar una imagen de la sección en una pantalla de video. (18.3)

**Microscopio de fuerza atómica** (AFM, *atomic force microscope*). Un instrumento de escaneo de alta resolución que se está volviendo cada vez más importante en la nanotecnología y la biología molecular. El AFM funciona al escanear una sonda delicada sobre la superficie de la muestra. (18.7)

**Modelos animales.** Animales de laboratorio que muestran características de una enfermedad humana particular. (18.24)

**Montaje completo.** Un espécimen que debe observarse con un microscopio que sea un objeto intacto, ya sea vivo o muerto, y puede ser un organismo entero intacto o una pequeña parte de un organismo grande. (18.2)

**Mutagénesis dirigida al sitio.** Una técnica de investigación para modificar un gen de manera predeterminada a fin de producir una proteína con una secuencia de aminoácidos específicamente alterada. (18.25)

**Protoplasto.** Una célula desnuda de una planta cuya pared celular ha sido digerida por la enzima celulasa. (18.9)

**Punto isoeléctrico.** El pH al cual las cargas negativas de los aminoácidos componentes de una proteína son iguales a las cargas positivas de los aminoácidos componentes, por lo que la proteína es neutra. (18.11)

**Ratones knockout.** Los ratones, nacidos como resultado de una serie de procedimientos experimentales, carecen de un gen funcional que normalmente contendrían. (18.25)

**Reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, *polymerase chain reaction*). Una técnica en la que una sola región del DNA que puede estar presente en cantidades extremadamente pequeñas, puede amplificarse de forma barata y rápida. (18.21)

**Reconstrucción de una sola partícula.** Una técnica que emplea la criomicroscopia electrónica para visualizar y analizar numerosas macromoléculas purificadas (vistas como partículas) para resolver la estructura de una macromolécula o complejo macromolecular. (18.16)

**Réplica.** Molde de metal y carbono de una superficie de tejido utilizada en microscopia electrónica. Las variaciones en el grosor del metal en diferentes partes de la réplica causan variaciones en el número de electrones que penetran para llegar a la pantalla de visualización. (18.5)

**Replicación por congelación y fractura.** Técnica en la que una muestra de tejido se congela primero y luego se golpea con una cuchilla que fractura el bloque de tejido a lo largo de las líneas de menor resistencia, que a menudo resulta en una línea de fractura entre las dos hojas de la bicapa lipídica; los metales luego se depositan en las superficies expuestas para crear una réplica sombreada que se analiza mediante microscopia electrónica. (18.5)

**Resolución.** La capacidad de ver dos puntos vecinos en el campo visual como entidades distintas. (18.1)

**Sección.** Una fracción muy delgada de tejido. (18.2)

**Sistema de levadura de dos híbridos.** Una técnica utilizada para buscar interacciones proteína-proteína. Depende de la expresión de un gen informador, como la $\beta$ galactosidasa, cuya actividad se monitorea fácilmente mediante una prueba que detecta un cambio de color cuando la enzima está presente en la población de células de levadura. (18.12)

**Tinción negativa.** Procedimientos en los que se acumulan depósitos de metales pesados en cualquier parte de la rejilla de la muestra, excepto en la ubicación de los materiales particulados muy pequeños, incluidos agregados de alto peso molecular, como virus, ribosomas, enzimas multisubunidades, elementos citoesqueléticos y complejos de proteínas. (18.5)

**Transducción.** La incorporación de un gen en un genoma celular por medio de un virus. (18.24)

**Transfección.** Un proceso mediante el cual el DNA desnudo se introduce en las células cultivadas, lo que generalmente conduce a la incorporación del DNA en el genoma celular y su posterior expresión. (18.24)

**Transgén.** Un gen que se ha incorporado de manera estable en un genoma celular por el proceso de transfección. (18.24)

**Vida media.** Una medida de la inestabilidad de un radioisótopo o, de manera equivalente, el tiempo requerido para que la mitad del material radiactivo se desintegre. (18.8)

# Índice

*NOTA*: Una f después de una página denota figura; t denota tabla; fn señala nota al pie; HP es Perspectiva humana; EP se refiere a Vía experimental.


107f, 111f, 218, 218f, 219
16S rRNA, 27EP
18S rRNA, 27EP
2-fenilaminopirimidina, 75f, 76
2-hidroxiglutarato (2-HG, *2-hydroxyglutarate*), 648 5S rRNA, 415-416 611-612, 611f 666-668, 666f, 667f, 668f

## A

Aberraciones, 694
Abertura numérica (N.A, *numerical aperture*), 694
Abscisión, 546f, 568, 568f, 570
Absorción de luz, 203-205, 205f
A-bungarotoxina, 148EP
Aceites, 46f, 47
Aceptor primario de electrones, 207
*Acetabularia*, 21
Acetilcolinesterasa (AChE, *acetylcholinesterase*), 148EP, 149EPf, 165
Acidez estomacal, 20HP, 154, 402HP
Ácido conjugado, 38
Ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*). *Véase* DNA
Ácido gamma-aminobutírico (GABA, *gamma-aminobutyric acid*), 164
Acido glutámico, reacciones de ionización de, 50, 52f
Ácido *P*-aminobenzoico (PABA, *P-aminobenzoic acid*), 102HP
Ácido ribonucleico (RNA, *ribonucleic acid*). *Véase* RNA
Ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, *very-long-chain fatty acids*), 193-194, 197HP
Ácidos grasos, 46-47, 46f, 47f, 48f
Ácidos nucleicos, 77-79, 378EP
- bases nitrogenadas en, 78, 78f
- fraccionamiento de, 719-721
- sedimentación de
  - centrifugación de equilibrio, 720-721, 721f
  - velocidad de sedimentación, 720, 721f
- separación de, por ultracentrifugación, 719-721, 721f

Ácidos, 38-39, 39t
Aciltransferasas, 131
Acoplamiento, 288, 289, 289f
Acoplamiento de excitación-contracción, 350-351,350f, 351f
Acoplamiento de las reacciones endergónicas y exergónicas, 88
Acoplamiento de transporte
- a gradientes iónicos existentes, 155-156, 156f
- a la hidrólisis de ATP, 152-154

Acromegalia, 75
ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*), hormona adrenocorticotrópica, 591EP, 591EPf, 591t, 595HP, 601t
Actina, 3, 4f, 5, 9f, 137, 138f, 139
Activación transcripcional, 495-499, 495f
- coactivadores en, 496-499
- de polimerasas pausadas, 499
- ejemplo de, 494, 495f
- potenciadores en, 495
- promotores en, 495-496

Activadores transcripcionales, 488
Actividad específica, 712
Actividades de la exonucleasa de DNA polimerasas, 523, 525f
Acuaporinas, 124f, 142, 143f
Adcetris, 655
Adenilil ciclasa, 587t, 589, 590-593EP, 591EPf, 591EPt, 592EPf, 593EPf, 593EPt, 599-600, 600f
Adenina (A), 78, 78f, 373
Adenoma tiroideo, 594HP, 594HPt
Adenomas, 594HP, 645, 650, 650f
Adenovirus, 21HP, 23, 24f, 158HP, 420-421, 631, 641, 643
Adherencias focales, 234-235, 235f, 236f
Adhesión célula-célula, 237-238
Adhesión celular, 237-238
- célula-célula, 237-238
- en la inflamación, 241-243HP, 242HPf
- en la metástasis, 241-243HP, 243HPf
- moléculas, 238f, 239
- receptores, en señalización transmembrana, 245

Adicción a la nicotina, 148EP
Adicción oncogénica, 656
Adipocitos, 47
Adrenalina. *Véase* Epinefrina
Adrenoleucodistrofia (ALD, *adrenoleukodystrophy*), 197HP
Adrenoleucodistrofia ligada a X (X-ALD, *X-linked adrenoleukodystrophy*), 197HP
Aerobios, 169
AFM de alta velocidad (HS-AFM, *high-speed AFM)*, 708, 708f
Agammaglobulinemia, 665
Agammaglobulinemia congénita, 665
Agente oxidante, 103
Agente reductor, 103
Agentes mutagénicos, 371-372
Agregación plaquetaria, integrinas en, 233-234, 233f
*Agrobacterium tumefaciens*, 734, 734f
Agua
- difusión de, a través de membranas, 141-142, 141f, 142f
- entropía cuando el agua se congela, 85, 85f
- flujo de electrones de, a PSII, 208-210, 209f
- propiedades de soporte vital de, 37-38, 38f
- transformación termodinámica de agua-hielo, 85, 85f, 85t

AHL (*N-acyl homoserine lactone*), N-acil homoserina lactonas, 583
AIDS. *Véase* Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS)
Aisladores, 495
Ajeno, distinguiendo de propio, 686-688
Ajuste inducido, 94-95, 95f
AKT (PKB). *Véase* Proteína cinasa B (PKB, *protein kinase B*)
Alcaptonuria, 405
Aldara, 664
Aldosa, 42, 43, 43f
Aldotetrosas, 42, 43f, 49
Alelo *FMR1*, 389HP
Alelo *HD*, 388HP
Alelos, 368
Alelos del MHC, 684-685
*Aliivibrio fischeri*, 582, 583
Alloway, J. Lionel, 379EP
Almidón, 44f, 45
ALN-RSV01, 433HP
Alta fidelidad durante las DNA polimerasas 523-526, 525f
Altman, Sidney, 451EP
Alzhemed, 66
*Amanita phalloides*, 309
Ambros, Víctor, 433-434
Amiloide, 64-67HP, 64HPf, 65HPf, 66HPf
Amiloidosis mediada por transtiretina (ATTR, *transthyretin mediated amyloidosis*), 433HP
Aminoácidos
- como portador extracelular, 586
- en la cadena polipeptídica, 49-50, 49f
- estereoisomerismo de, 49, 49f
- estructuras de, 49-50, 49f, 51f
- hidrofílico, 36, 52, 52f
- hidrofóbico, 36, 52-53, 52f, 128, 128f
- pronosticar, por secuenciación del genoma, 71, 73
- residuos, 50
- secuencia de proteínas
  - en el plegado de las proteínas, 61, 63HP, 63HPf
  - en enhebración, 61-62

en la evolución y adaptación de proteínas 76-77
en mutagénesis dirigida a sitio, 74-75
estructura primaria correlacionada con, 56
estructura terciaria correlacionada con, 56, 57f, 61
estructura tridimensional determinada por, 70HP
sustituciones, 76-77, 7f
Aminoácidos hidrofílicos, 36, 52, 52f
Aminoácidos hidrofóbicos, 36, 52-53, 52f
Aminoacil-tRNA sintetasa (aaRS, *aminoacyl-tRNA synthetase*), 441, 441f, 445
Amplificación de señal, cAMP en, 600
Amplificación enzimática del DNA por PCR, 726-728
Amyvid, 66HPf
Anaerobios, 169
Anafase
de la meiosis, 572f, 576f, 577
de la mitosis, 553f, 562-567, 563f
actividades durante SCF y APC, 562-564,563f
eventos de, 564, 564f
movimiento cromosómico en, 564-566, 565f
punto de control del ensamblaje del huso, 566-567, 566f
Anafase A, 564
Anafase B, 564
Análisis de expresión génica, 651-654, 652f, 653f, 654f
Análisis de la localización del genoma completo, 493-494, 493f
Análisis del genoma, 390
Análogo de GTP no hidrolizable, 592EP
Anderson, Richard, 298EP
Anemia falciforme, 53, 53f, 437
Anemias hemolíticas, 137
Anestésicos, 161
Aneuploidía, 566, 577-578HP, 630, 630f, 643, 645, capítulo 14, capítulo 16
Anfinsen, Christian, 60
Angiogénesis, 659-660, 659f
Angstrom (Å), 21
Anillo *c* oligomérico, 188, 189, 189f
Anillo de porfirina, 204, 204f
Anillos, 249
Animales transgénicos, 733-734, 733f
Anión, 34
Anquirina, 137, 138f, 139
Antena, 205
Antibióticos, 100-102HP
modos de, antibióticos en uso clínico y, 101HPt
penicilina, 99, 100HP, 101HPt, 102HP
Anticodón, 440, 441f
Anticuerpo humanizado, 655
Anticuerpo monoclonal, 655
Anticuerpos anti-$CD_{20}$, 655
Anticuerpos monoclonales, 655, 670-671HP, 738-739, 739f
Anticuerpos, 665
diversidad en, 678, 680, 682-683
dominios, 680, 680f
estructura modular de, 678-681, 679f, 679t, 680f
interacción antígeno-anticuerpo, 680-681, 681f
monoclonal, 655, 670-671HP, 738-739, 739f
respuestas de anticuerpos primarios y secundarios, 678-679, 679f
uso de, 738-740
Antidepresivos, 165
Antígeno, 665
Antígeno T grande, 528
Antígenos del grupo sanguíneo, 122-123, 123f, 398, 684
Antígenos exógenos, 685, 686
Antígenos o neoantígenos asociados a tumor, 655
Antígenos timo-independientes, 666f, 667
Antioxidantes, 35HP
Antiportador, 156
Antisuero, 738
Antisuero policlonal, 738
APECED, 686
Apetito, 111, 165
Apolipoproteína B-100, 302
Apoptosis, 621-624, 622f, 665, 676, 677, 683, 688, 688f, 689
oncogenes que codifican productos que afectan, 648, 648f
vía extrínseca, 622-623, 623f
vía intrínseca, 623-624, 624f
Apoptosoma, 623
*Arabidopsis thaliana*, 16, 17f
Árboles filogenéticos, 27EP, 28EP, 28EPf, 29EP
Archaebacteria, 13, 28-29EP, 76
Archaeplastida, 28EPf
Arkwright, J. A., 378EP
Arnold, William, 205
Arnon, Daniel, 213
Arrastramiento del neutrófilo, 354fn
Arrastre de exones, 429
Arrestinas, 589-590, 590f
Artefacto, 703
Artritis reumatoide, 669HP, 670HP, 671HP, 740, capítulo 11, capítulo 18
Arzerra, 655
Aspecto trilaminar de las membranas plasmáticas, 115f
Áster, 557, 558f
Ataque cardiaco/enfermedad cardiaca, 18HP, 112HP, 231, 233, 241HP, 297EP, 302-303, 302f, 461
Ataxia-telangiectasia (AT, *ataxia-telangiectasia*), 550
Atenuación, 459
Aterosclerosis, 302
Átomo de carbono asimétrico, 42-43, 43f, 49
Átomo electronegativo, 32
Átomos de carbono
asimétrico, 42-43, 43f, 49
en colesterol, 39, 40f
estado de oxidación de, 103, 104f
química de, 39
Átomos de cobre, 180, 181f
Átomos. *Véase también* Átomos de carbono
electronegativo, 32
estructura electrónica de, 32, 33f
Aubagio, 671HP
Aurora B cinasa, 555, 566-567, 570
Autoanticuerpos, 668
Autoensamblaje, 60, 62, 79
Autofagia, 292, 292f
Autofagosoma, 292, 292f
Autolisosoma, 292, 292f
Autorradiografía, 260, 261f, 709-710
Autorregulación de las células, 6-7, 6f
Autótrofos, 200
Avastina, 659
Avery, Oswald, 379EP
Avery, Roy, 379-380EP
Axel, Richard, 603
Axonema, 329-331, 330f, 331f
Axones, 159-163, 159f, 160f, 161f, 162f, 163f, 164f
Azafrán de otoño, 309
Azidotimidina (AZT, *azidothymidine*), 526
Azúcares simples, estructura de, 42, 42f
Aβ42, 64-66HP, 65HPf

## B

Bacteria
control de la expresión génica en, 456-460
genomas bacterianos, organización de, 456
operón bacteriano, 456-459, 457f
ribointerruptores, 459-460
transcripción en, 410-411, 410f
Bacteria verde del azufre, 200, 200f
Bacteriófagos, 23, 24f, 25
Bacteriorrodopsina, 155, 155f
Balsas de lípidos, 132-133, 132f
Baltimore, David, 633EP
Banda preprofase, 571
Bapineuzumab, 65-66HP
Barrera hematoencefálica, 247
Base conjugada, 38-39
Base molecular de la contracción, 348-350, 349f
Base química de la vida, 31-80
Bases, 38-39, 39t
Bazo, 231f, 662, 662f
Bennett, J. Claude, 681
Berg, Paul, 692, 723
Berget, Susan, 420
Bernard, Claude, 147-148EP
Betzig, Eric, 699-701
Beutler, Bruce, 664
Bexxar, 655
Bibliotecas de CDNA, 731-732, 732f
Bibliotecas de DNA, 730-732
cDNA, 731-732, 732f
genómico, 731
Bibliotecas genómicas, 731
Bicapa lipídica, 117f, 120-121, 121t
asimetría de, 121-122, 122f
definido, 117
folleto (*Véase* Folleto)
fosfolípidos en, 117f, 118f, 120, 120f
naturaleza e importancia de, 120-121, 121f

proteína en, 117, 118f
temperatura y estructura de, 130-131, 130f, 131t
Biocombustibles, 199, 220HP
Bioenergética, 82
Biología sintética, 22-23, 22f
Biomarcadores, 72
Biomasa de células procariotas, 15, 15t
Biopelícula, 13, 157HP, 583
Bioquímicos, 39
Biosíntesis de la membrana, 271-272, 272f, 273f
Birnbaumer, Lutz, 591EP
Bishop, J. Michael, 633EP
Bivalente, 369, 575, 575f, 576-577, 576f, 579HP
Blastema, 540
Blastómeros, 578HP
Blobel, Günter, 268
Block, Steve, 319EP
Bomba de eflujo, 102HP
Bomba de protones, citocromo oxidasa como, 183, 184f
Bomba de sodio y potasio, 153-154, 153f, 154f
Bombas tipo P, 153-154
Bombas tipo V, 154-155
Botón terminal, 159, 159f, 163, 163f, 164, 164f
Boyer, Herbert, 723
Boyer, Paul, 189, 190
Brenner, Sydney, 406
Brinster, Ralph, 733
Bromodesoxiuridina (BrdU, *bromodeoxyuridine*), 515, 516f
Brote vesicular, 263, 264f, 288, 296f, 301f
Brown, Michael, 297-298EP
Büchner, Eduard, 90
Büchner, Hans, 90
Buck, Linda, 603
Búfers, 38-39
Burk, Dean, 98
Burnet, F. MacFarlane, 666
Búsqueda de homología, 579

## C

Cadang-cadang, 25
Cadena β, 54, 54f
Cadena de fitol hidrofóbica, 204, 204f
Cadena de polipéptidos, 49, 49f
Cadena de poliubiquitina, 300fn
Cadena de transporte de electrones, 105, 180-182, 182f
Cadena respiratoria. Véase Cadena de transporte de electrones
Cadenas kappa (κ), 679, 681-683
Cadenas lambda (λ), 679, 680f, 683, 683fn
Cadenas laterales, 49f, 50-53, 51f
cisteína, 50, 51f
glicina, 50, 51f
hidrofílico, 52, 52f
hidrofóbico, 52-53, 52f
no polar, 50, 51f
polar, cargada, 50, 51f
polar, sin carga, 50, 51f
prolina, 50, 51f
reacciones de ionización del ácido glutámico y lisina, 50, 52f
Cadenas laterales no polares, 50, 51f
Cadenas laterales polares
cargada, 50, 51f
sin carga, 50, 51f
Cadenas laterales polares cargadas, 50, 51f
Cadenas laterales polares sin carga, 50, 51f
Cadenas ligeras, 678, 679, 679t, 681
cadenas kappa (κ), 679, 681-683
cadenas lambda (λ), 679, 680f, 683, 683fn
Cadenas pesadas, 678-679, 679fn, 679t, 681, 683
Cadherinas, 238f, 239-241, 240f, 241f
en desarrollo embrionario, 239-240, 240f
en desmosomas, 244-245, 245f
en uniones adherentes, 244-245, 244f, 245f
enfermedades genéticas relacionadas con, 240, 241f
*Caenorhabditis elegans*, 16, 17f, 147
Caja CAAT, 492-493
Caja GC, 492-493
Caja TATA, 492-493
CAK (*Cdk-activating kinase*), cinasa activadora de CDK, 547, 548f
Calcio ($Ca^{2+}$)
CICR, que ocurre en la célula del músculo cardiaco, 614, 615f
como mensajero intracelular, 613-617
concentración citoplásmica de $Ca^{2+}$ en células vivas, visualización, 614-615, 614f, 615f
concentraciones de calcio en las células vegetales, regulación, 617, 617f
entrada de calcio operada por depósitos, 615, 616f
$IP_3$ y canales de $Ca^{2+}$ activados por voltaje, 613-614
proteínas de unión al $Ca^{2+}$, 615-616, 616f, 616t
Calentamiento global, 219-220HP
Callo, 710-711
Calmodulina (CaM, *calmodulin*), 616, 616f, 616t, 617
Cambio de clase, 683
Cambios de conformación
dinámicos, en proteínas, 58
en el receptor nicotínico de la acetilcolina, 150-151EP, 151EPf
en miosina, 58
en proteína de membrana integral, 128-130, 129f, 130f
revelado en cristalografía de rayos X, 68EP
Cambio de energía libre estándar (ΔG°′), 86-87, 87t
Cambio de energía libre, 85-88
condiciones estándar en, 86-87, 86fn, 87t
en la difusión de un electrólito en la célula, 140
en reacciones metabólicas, 86-88
en reacciones químicas, 85-86
Cambios dinámicos con proteínas, 58, 58f
Caminata cromosómica, 731
cAMP
como segundo mensajero, 595-596, 595f
descubrimiento de, 595, 596
en amplificación de señal, 600
en la movilización de glucosa en sangre, 600, 600f,601f
formación de, 595, 595f
proteína de unión a elementos de respuesta, 600, 601f
respuestas hormonales mediadas por, 600-602,601t
vías de transducción de señal, 600-602, 602f
Canal de iones de $K^+$ (KcsA, *$K^+$ ion channel*), 144-145, 144f, 145f
Canal de iones $K^+$ de Shaker de la *Drosophila*, 146f
Canal de $K^+$ activado por voltaje (Kv), 145-147, 146f
Canal iónico de Shaker, 146f
Canales del $Ca^{2+}$ activados por voltaje, $IP_3$ y 613-614
Canales de catión, 144, 164, 165
Canales de fuga de $K^+$, 159
Canales iónicos activados, 144-147
canales activados por ligando, 144
canales activados por voltaje, 144-147
canales mecano-activados, 144
definido, 144
Canales iónicos, 143-147
activado, 144-147
de Shaker, 146f
defectos en, 157-158HP, 158HPt
definido, 143
medición, 143-144, 143f
prueba de existencia, 143
Canales iónicos activados por voltaje, 144
Cáncer, 627-660
análisis de expresión génica, 651-654, 652f, 653f, 654f
causas de, 631-632
células, propiedades de, 628-631, 629f
aneuploidía, 630, 630f
células originarias de tumores malignos 636-637, 637f
efectos de privación de suero en crecimiento de, 629-630, 630f
metástasis, 628, 628f
tasa de crecimiento, 629, 629f
combatir, estrategias para, 654-660
angiogénesis, 659-660
células madre del cáncer, 658-659
inhibición de actividad de proteínas que promueven el cáncer 656-658
inmunoterapia, 654-656
quimioterapia, 628, 637, 644, 648, 653, 654, 655, 659
terapias seleccionadas, 654
como trastorno genético, 636-638
esfuerzos de investigación, 628
fenotipo mutador, 649
gen *PTEN*, 646
gen *RB*, 640-641, 641f

gen *TP53*, 642-645, 642f
genes *APC*, 645
genes *BRCA1*/*BRCA2*, 512, 645
genes supresores de tumores, 638-646, 638f, 640t
resumen de, 638-639
genoma del cáncer, 649-651
microRNA, 649
mieloma múltiple, 679, 680f, 681, 738-739, 739f
nuevos casos y muertes en Estados Unidos en 2015, 628, 629f
oncogenes, 646-648
activación de protooncogenes a, 638, 639, 639f
descubrimiento de, 633-636EP
resumen de, 638-639, 638f
terapia, PLK1 como objetivo para, 433HP, 433HPf
Cáncer de cerebro, 629f, 642, 646, 647, 655, 659
Cáncer de colon
causa de, 631, 632
esfuerzos de investigación, 628
genes supresores de tumores, 640t
mutaciones genéticas en, 642f, 645, 650, 650f, 658
NSAIDS y, 632
receptor de EGF y, 655
Cáncer de cuello uterino, 631, 632, 637, 637f, 660
Cáncer de estómago, 631f, 642f
Cáncer de hígado, 631, 642f
Cáncer de mama
análisis de expresión génica, 652-653, 654f
*BRCA1* y, 512, 645
cariotipo de célula de, 630f
causa de, 631
determinaciones de PSA para detectar, 660
esfuerzos de investigación, 628
fosforilación de tirosina en las células, 585f
genes supresores de tumores en, 640t
genética y, 636
inmunoterapia para, 655
medicamentos inhibidores de proteínas para, 657
mutaciones genéticas en, 640, 642f, 644
nuevos casos y muertes en Estados Unidos en 2015, 629f
vía PI3K en, 651
Cáncer de ovario, 642f, 645, 655, 658
Cáncer de piel. *Véase* Melanoma
Cáncer de próstata
causa de, 632
esfuerzos de investigación, 628
genética y, 636
inmunoterapia, 655
medicamentos inhibidores de proteínas para, 657
mutaciones *RB*, 640
mutaciones TP53 en, 642f, 644
nuevos casos y muertes en Estados Unidos en 2015, 629f
prueba PSA para, 72
Cáncer de pulmón, 629f, 631, 640, 640t, 642f, 655, 658
exposición al radón y, 537HP
Cáncer linfático, 648, 679
mieloma múltiple, 679, 680f, 681, 738-739, 739f
Cáncer pancreático, 640t, 642f, 644, 655, 659
Capacidad regenerativa, 539, 540
Capecchi, Mario, 735
Cápsidos, 23, 24f
Captación postraduccional de proteínas, 304-307
en cloroplastos, 306-307, 306f
en mitocondrias, 304-306, 304fn, 305f
en peroxisomas, 304
Captopril, 99
Cara ectoplásmica, 125f
Cara interna de la membrana, 170
Cara protoplásmica, 125f
Carbohidratos, 42-46
aldotetrosas, 42, 43f
azúcares simples, estructura de, 42, 42f
en membranas plasmáticas, 122-123, 122f, 123f
enlaces glucosídicos, 43-44, 43f, 44f
estereoisomerismo, 42-43, 43f
formación de piranosa α y β, 43, 43f
polisacáridos, 44-46
estructural (celulosa, quitina y glicosaminoglucanos), 44f, 45-46, 45f
nutricional (glucógeno y almidón), 44f, 45
Carboximetilcelulosa (CM, *carboxymethyl cellulose*), 712
Carcinógenos 631, 632f, 643
Carcinoma de células basales, 537HP
Carcinoma de células escamosas, 537HP
Carcinoma de vejiga, 635EP
Cargador de pinza, 523, 524f
Cariotipos, 473, 630f, 640, 645, 651
Carotenoides, 204-205
Cas9, 737, 738f
Cascada de Ras-MAP cinasa, 608-609, 609f
Caspasa ejecutora, 623
Caspasa iniciadores, 623
Caspasas, 622
Casquete de metilguanosina, 423, 424, 424f
Cassel, Don, 592-593EP
Catabolismo de glucosa, 104-105
Catálisis rotacional, 190, 192f
Catalizador, mRNA como, 450-453EP, 451f, 452f
Catión, 34
*Caulerpa*, 21
Cdk2, 549, 549f, 550, 551f, 552, 557
Cebador, 518-519, 518f, 519f
Cech, Thomas, 425, 450-451EP
Célula natural asesina (NK, *natural killer*), 665
Célula de la vaina del haz, 218, 218f
Célula postsináptica, 163, 165
Célula presináptica, 163
Células
componentes de, 21-23
descubrimiento de, 2-3, 2f
microscopia, 2
teoría celular, 2-3
eucariota (*Véase* Eucariotas)
exceso de información a través de, 406-407, 407f
fraccionamiento del contenido por centrifugación diferencial, 711-712, 711f
interacción intercelular en membranas plasmáticas, 116
interactoma de, 72, 73
origen de, 3
procariota (*Véase* Procariotas)
propiedades de, 3-7
actividades mecánicas de, 6
autorregulación de, 6-7, 6f
complejidad de, 3-5
energía adquirida y utilizada por, 5-6, 6f
evolución de, 7, 17f
información genética en, 5
organización de, 3-5, 4f
reacciones químicas llevadas a cabo por, 6
receptores de, 6
reproducción de, 5, 5f
respuesta a estímulos, 6-7, 7f
robustez de, 6
secuestro, 257, 258
tamaño de, 21-23, 22f
viroides, 25
virus, 23-25
Células B, 665
activación de, por células TH, 689
reordenamientos del DNA que producen genes que codifican receptores de antígeno de, 681-683, 682f, 683f
selección clonal, 666-668, 666f, 667f, 668f
Células B de memoria, 667-668
Células bacterianas, replicación del DNA en, 516-520
desenrollado, 517-518, 517f
DNA polimerasas, propiedades de, 518-519, 518f, 519f
horquillas de replicación, 517
investigación, progreso temprano en, 516
replicación biodireccional, 517
replicación semidiscontinua, 519-520, 519f, 520f
Células capilares, 344, 345f
Células cartílago, matriz extracelular de, 224, 225f
Células de anclaje, 234-237
adhesiones focales, 234-235, 235f, 236f
difusión celular, 234, 234f
hemidesmosomas, 236-237, 236f
Células del mesófilo, 218, 218f
Células dendríticas (DC, *dendritic cells*), 676, 677f, 678, 685, 686, 689
Células diferenciadas
de la membrana plasmática, 118, 136, 136f

mitocondria en, 15, 16
organelo en, 15-16
Células eucariotas unicelulares, 15-16, 15f
Células haploides, como producto de la meiosis, 572f, 577, 578f
Células HeLa, 3, 3f, 627, 628
Células heterotróficas anaeróbicas, 26EP
Células linfoides, 231f, 652, 667, 686
Células madre
adulta, 18HP, 18HPf
cáncer, 658-659
definido, 18HP
embrionaria, 18-19HP, 19HPf
hematopoyética, 665, 666f, 671HP
mesenquimal, 18HP
pluripotente inducida, 19-21 HP, 20HPf
Células madre adultas, 18HP, 18HPf
Células madre del cáncer, 658-659
Células madre embrionarias, 18-19HP, 19HPf, 735-736
Células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*), 18HP, 665, 666f, 671HP
Células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*), 18HP, 235
Células madre pluripotentes inducidas (células iPS, *induced pluripotent stem*), 19-21HP, 20HPf, 489
Células nerviosas (neuronas)
estructura de, 159f
función de, 159
postsináptica, 148EPn, 164, 165
presináptica, 163, 163f, 164, 165
transmisión sináptica, 162-165, 163f, 164f
Células NIH3T3, 635EP
Células plasmáticas, 667, 668, 668f, 678
Células presentadoras de antígeno (APC, *antigen-presenting cells*), 670HP, 672-673EP, 676, 676f
Células quiescentes, 541-542
Células satelitales, 18HP
Células secretoras, en ER rugoso, 267-268, 267f
Células T, 621
activación y mecanismo de acción, 675-678
células dendríticas, 676
células presentadoras de antígeno, 670HP, 672-673EP, 676, 676f
citocinas, 676-677, 677t
reordenamientos del DNA que producen genes que codifican receptores de antígeno de, 681-683, 682f, 683f
subclases de, 677-678
células T auxiliares (células $T_H$), 677-678, 677fn
células T citotóxicas (CTL, *cytotoxic T cells*), 677
células T reguladoras (células $T_{Reg}$), 678
Células T auxiliares (células TH), 677-678, 677fn, 677t
activación de, por APC, 689
activación de las células B por, 689
Células T citotóxicas (CTL, *cytotoxic T cell*), 672-674EP, 677, 677t, 678, 686
Células T reguladoras (células $T_{Reg}$), 678
Celulosa, 44f, 45-46, 45f
Celulosa sintasa, 254, 255f
CENP-A, 477, 556
Centelleantes, 709
Centrifugación de equilibrio, 720-721, 721f
Centrifugación diferencial, fraccionamiento del contenido de una célula por, 711-712, 711f
Centriolos, 321
Centro hierro-azufre, 180, 181f
Centro Nacional de Investigaciones de Primates de Wisconsin (WNPRC, *Wisconsin National Primate Research Center*), 112HPf
Centrómeros, 556-558, 557f, 558f, 574f
Centros organizadores de microtúbulos (MTOC, *microtubule-organizing centers*), 321-323
centrosomas, 321-322, 321f, 322f
cuerpos basales, 322, 329, 331f
nucleación de microtúbulos, 322-323, 323f
Centrosoma, 477-478, 477f
Centrosomas, 321-322, 321f, 322f
Cestería poligonal, 297EP
Cetosa, 42, 42f
cGMP, 595, 603, 620, 620f, 697
Chalfie, Martin, 697
Chang, Annie, 723
Changeux, Jean-Pierre, 149EP
Chaperonas moleculares, 62, 62f, 67-70EP
Chaperoninas, 68EP
Chargaff, Erwin, 380EP
Charpentier, Emmanuelle, 737
Chase, Martha, 380EP
Chips, DNA, 485-487, 486f
*Chlamydomonas flagella*, 334HP
Chow, Louise, 420
Cianobacteria, 14, 14f, 200-201, 214
Ciclinas, 542-543
ciclinas-Cdk en el ciclo celular de mamíferos, 549, 549f
mitótico, 547
niveles, en MPF, 543f, 545EP, 545EPf, 546EP
cinasas dependientes de ciclina, 547
Ciclinas mitóticas, 547
Ciclo celular, 540-552
fases de, 540-541, 540f
*in vivo*, 541-542
regulación de, 542-543, 542f, 543f
Ciclo de Calvin (ciclo de Calvin-Benson), 214-215, 214f, 215f
Ciclo de Krebs, 173
Ciclo del ácido cítrico, 173
Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, *tricarboxylic acid*), 105, 173, 175, 175f, 176f
Ciclo del centrosoma, 556, 557f
Ciclosporina A, 670HP
Cilio, 327-333, 328f
axonema, 329-331, 330f, 331f
en desarrollo y enfermedad, 333-334HP, 334HPf
estructura de, 329-331, 330f
locomoción, mecanismo de, 331-333, 332f, 333f
resumen de, 327-329, 328f
Ciliopatías, 333-334HP
Cinasa ABL, 75-76, 75f
Cinasa activadora de Cdk (CAK, *Cdk-activating kinase*), 547, 548f
Cinasa tipo polo, 555, 557
Cinasas dependientes de ciclinas (Cdks, *cyclin-dependent kinases*), 546
Cinesina, 316-317, 316f, 319-320EP
movimiento procesivo de, 316
tamaño de paso de, 319-320EP, 320EPf
Cinética del tipo de saturación, 151, 152f
Cinetocoro, 556, 556f
Cinetocoros, 555, 556, 556f
Cisteína, 50, 51f
Cisterna, 265-266, 266f, 276, 277f, 278
Cisterna *cis*, 276, 277f, 278, 279
Cisterna medial, 276, 277f, 278, 280
Cisterna trans, 276, 277f, 278, 279, 280
Citosinas, 676-677, 677t
Citocinas proinflamatorias, 670HP
proinflamatoria, 670HP
Citocinesis
abscisión, 546f, 568
definido, 552
en células vegetales, formación de placas celulares y, 570 571, 571f
miosina en, 568, 569, 569f
resumen de, 567-570, 568f
teoría del anillo contráctil, 568, 569f
tiempo de, 570, 570f
Citocromo $b_6f$, 210, 210f
Citocromo $bc_1$ (complejo III), 185
Citocromo *c*, 182, 182f
Citocromo oxidasa (citocromo c oxidasa), 185-186, 186f
actividad, resumen de, 186f
como bomba de protones, 183, 184f
Citocromos, 180, 181f
Citoesqueleto
centros organizadores de microtúbulos, 321-323
cilio, 327-333, 328f
citoesqueleto bacteriano, 362-364, 363f
filamentos de actina, 338-344
filamentos intermedios, 335-338
flagelo, 327-333, 329f
funciones, resumen de, 310-311, 310t
microtúbulos, 311-312
motilidad celular, 353-358
organización y contracción muscular, 344-351
procesos dependientes de la actina durante el desarrollo, 361-362, 361f, 362f
proteínas, 622
proteínas de unión a la actina, 351-353
proteínas motoras, 315-319
venenos, fármacos y, 309, 310
Citoplasma, 258, 258f
concentración de $Ca^{2+}$ en células vivas, visualización, 614-615, 614f, 615f

de células eucariotas, 10, 12f
partición de, 558, 559f
Citosina (C), 78, 78f, 373
Citosol, 8f, 9f, 10, 11f
Claude, Albert, 262
Claudinas, 247
Clonación de animales, 483-484, 484f
Clorofila, 204, 204f
Clorofila aislada, 204
Clorofila del centro de reacción, 205
Cloroplastos, 200
captación postraslacional de proteínas en, 306-307,306f
estructura, 201-202, 201f
Cloroplastos aislados, 204
rubisco en, 67-70EP
Cloruro de metiltioninio, 67HP
*Clostridium tetani*, 671
Clúster de Mn-Ca, 208f, 209-210
Coactivadores, 496-499
Coágulos de sangre, 46, 49, 229, 231, 233, 233f, 281, 302, 392, 586
Coanoflagelados, 222
Codificación de información genética, 436-439
código genético, 436-437, 437f, 438f
codones, identificación, 437, 439f, 440
Código de histona, 470-473, 471f, 472f
Código genético, 436-437, 437f, 438f
Codones
balanceo en la interacción entre los codones y anticodones, 441f
decodificación, función de los tRNA en, 439-442
identificación, 437, 439f, 440
Coeficiente de partición, 140-141, 141f
Coenzima Q (o ubiquinona), 180, 181f
Coenzimas, 90
Coenzimas reducidas, 175-177, 176f, 177f
Cofactores, 90
Cohen, Stanley, 604, 723
Cohesina, 554, 555f
Cola de poli (A) en 3′, 423, 424, 424f
Colágeno, 226-228, 227f, 228f
Colágenos fibrilares, 226
Colchicina, 310
*Colchicum autumnale*, 309
Cólera, 592-593EP
Colesterol
azúcares simples y, 42
como esteroide, importancia de, 47
en fosfolípidos, 120, 120f
en lípidos de membrana, 120, 120f
en membranas celulares, 47, 47f
estructura de, 39, 40f, 47f
Coley, William, 654
Colorante de trazado, 715
Combustibles fósiles, 199
Combustibles para el transporte, 219-220HP
Compactación cromosómica prematura, 542
Compartimentación, 115
Complejo abierto, 411
Complejo de enzima-sustrato (ES, *enzyme-substrate*), 92, 93f
Complejo de Golgi, 8f, 9f, 10, 11f, 27EP, 257, 276-284, 277f. *Véase también* Red del trans Golgi (TGN, *trans Golgi network*)
compartimentos de, 276, 278, 278f
glucosilación en, 278, 279f
morfología característica de, 276
partición durante la mitosis, 558
transporte vesicular en (*Véase* Transporte vesicular en el complejo de Golgi)
Complejo de pasajeros cromosómicos (CPC, *chromosomal passenger complex*), 570
Complejo de poro nuclear (NPC, *nuclear pore complex*), 462-465, 462f, 463f, 464f
Complejo de prerreplicación (pre-RC, *prereplication complex*), 527, 528f
Complejo de recolección de luz II (LHCII, *light-harvesting complex II*), 207, 208f
Complejo de reconocimiento de origen (ORC, *origin recognition complex*), 527, 528f, 529t
Complejo de unión de exones (EJC, *exon-junction complex*), 448
Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*), 672-675HP, 684-686
en la presentación del antígeno, 672-675HP, 672t, 673t, 674f, 675f
Complejo MHC-péptido, 673-674EP, 675EPf, 686, 689
Complejo multiproteico, 59-60, 59f
Complejo promotor de la anafase (APC, *anaphase promoting complex*), 562-564, 563f
Complejo regulador nexina-dineína (N-DRC, *nexin-dynein regulatory complex*), 329, 332
Complejo SCF, 562-564, 563f
Complejo sinaptonémico (SC, *synaptonemal complex*), 574-575, 575f
Complejo TIM, 304, 305f
Complejo TOM, 304, 305f
complejos de anillo de γ-tubulina (γ-TuRC, *γ-tubulin ring complexes*), 323, 323f
Complejos de ESCRT, 301, 568
Complejos de multisubunidad, que determinan estructura de, 717-719
Complejos en el transporte de electrones, 182-186, 183f
complejo I (NADH deshidrogenasa), 184-185, 184f
complejo II (succinato deshidrogenasa), 185
complejo III (citocromo $bc_1$), 185
complejo IV (citocromo c oxidasa), 185-186, 186f
Complejos Ndc80, 556f, 565f, 566
Complejos receptores de antígeno unido a la membrana, 683-684
Complejos Tic, 306
Complejos Toc, 306
Complemento, 664
Composición base, 374
Compuesto de plomo, 76
Comunicación intercelular de unión gap (GJIC, *gap-junction intercellular communication*), 249, 251-253EP, 251EPf, 252EPf, 253EPf
Concentradores, 72-73, 73f
Condensina, 554
Condiciones estándar en cambio de energía libre, 86-87, 86fn
Conducción saltatoria, 162, 162f
Conductancia, 143, 143f, 144, 145
Conexinas, 248-249
Conexones, 249
Conferencia de Asilomar, 692, 693
Conformación, 53-54, 54f
de integrinas, 232f
definido, 53-54
hélice alfa (α), 54, 127fn
iones de potasio activados por voltaje, 147, 147f
Congresión, 559
Conjugación en células procariotas, 12, 12f
Cono de crecimiento, 361, 361f, 362f
Constante catalítica (*K*cat), 98
Constante de disociación (*K*d), 86
Constante de equilibrio (*K*eq), 85-86, 87, 87t
constante de disociación, 86
Constante de Michaelis (*K*M), 97f, 98
Constante de Planck, 203
Constricción primaria, 555
Contraste, 695
Contraste de interferencia diferencial (DIC, *differntial interference contract*), 696
Control de calidad, 274
mRNA, 448-449
Control de procesamiento, 484
Control del ciclo celular, 546-552
proteínas cinasa en, 546-550
fosforilación/desfosforilación de Cdk, 547-548, 548f
inhibidores de la Cdk, 548
localización subcelular, 548-550, 549f
proteólisis controlada, 548
puntos de control, inhibidores de Cdk y respuestas celulares, 550-552, 551f
Control, mRNA, 448-449
Control postraduccional, 484
determinación de la estabilidad de la proteína, 509-510, 510f
Control redox, en la síntesis de carbohidratos, 215-216, 215f
Control transcripcional, 484
Control traslacional, 484, 505-508, 505f
control de la estabilidad del mRNA, 506-508, 508f
inicio de la traducción, 505-506, 506f
localización citoplásmica de los mRNA, 506, 507f
miRNA en, 508-509, 508f, 509f
Convergencia, en vías de señalización celular, 618, 618f, 619f

Copaxone, 670HP
Coprecipitación de proteínas, 714
Corey, Robert, 54
Corteza, 568
Corticosteroides, 670HP
Cotransportador $Na^+$/glucosa, 155-156, 156f
Cotransporte, 155-156, 156f
Coulson, A. R., 728-729
*Coxiella burnetii*, 303-304
CREB (*cAMP response element-binding protein*), proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP, 600, 601f
Crecimiento axonal, 361-362, 361f, 362f
  cono de crecimiento, 361, 361f, 362f
  desarrollo embrionario, cambios durante la formación celular, 362, 363f
Crescentina (CreS), 364
Cresta, 170
Crick, Francis, 373, 374-377, 513, 513f, 518, 633EP
Criofijación y uso de muestras congeladas, 703, 704-705
Criomicroscopia electrónica (cryo-EM, *electron cryomicroscopy*), 718-719, 718f
CRISPR RNA (crRNA), 435-436
CRISPR, 737, 738f
Cristal de sal, disolución de, 35, 35f
Cristalografía de rayos X, 55, 55f, 717-719, 717f, 719f
  cambios de conformación revelados en, 68EP
  cristales de proteínas de TCR adecuados para, 674EP
  cristalografía resuelta en el tiempo, 96, 97f
  de DNA topoisomerasas, 383f
  de la estructura de las proteínas integrales, 126f
  de la estructura de tRNA, 440f
  de la estructura y función del proteasoma, 510f
  de la interacción antígeno-anticuerpo, 681f
  de ribosoma procariota, 404
  de translocón, 270
  estructuras en, en comparación con las proteínas, 58
Cristalografía electrónica, 719
Cristalografía resuelta en el tiempo, 96, 97f
Cromátidas, 554, 554f, 564
Cromatina, 9f, 10, 11f, 20HP, 460, 460f
  complejos de remodelación, 496
  estado epigenético de, 647
  estructura
    niveles más altos de, 467-468, 467f, 468f
    niveles más bajos de, 465-467, 466f
    replicación del DNA y, 530-531, 531f
Cromatografía, 712-713
  afinidad, 713, 713f
  filtración en gel, 712-713, 713f
  intercambio iónico, 712, 713f
  líquido de alto rendimiento, 712
  purificación y caracterización de proteínas por, 712-713
Cromatografía de afinidad, 148EP, 713, 713f
Cromatografía de filtración en gel, 712-713, 713f
Cromatografía de intercambio iónico, 712, 713f
Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *high performance liquid chromatography*), 712
Cromatografía líquida en columna. *Véase* Cromatografía
Cromodominios, 472
Cromosoma accesorio, 369
Cromosoma artificial bacteriano (BAC, *bacterial artificial chromosome*), 731
Cromosoma artificial de levadura (YAC, *yeast artificial chromosome*), 731
Cromosoma marcador, 477
Cromosoma mitótico, estructura de, 473-478, 474f
  centromas, 477-478, 477f
  telómeros, 473, 475-477, 475f, 476f
Cromosomas
  como portadores de información genética, 369-370
  compactación, 544EP, 545EP, 552, 554, 574
  prematuro, 542
  definido, 368
  descubrimiento de, 368-369
  fertilización, proceso de, 368-369, 369f
  gigante, 371-373, 372f
  heterocromatina, 469-473
  homólogo, 369, 370f, 371, 371f
  inactivación del cromosoma X, 470
  mitótico, estructura de, 473-478, 474f
  politénico, 373
  sexo, 382, 469, 577-578HP
  trastornos humanos y aberraciones, 478-479HP
Cromosomas gigantes, 371-373, 372f
Cromosomas homólogos, 369, 370f, 371,371f
Cromosomas politénicos, 373
Cromosomas sexuales, 382, 469, 577-578HP
CSI1 (*cellulose synthase interactive protein 1*), proteína celulosa sintasa interactiva 1, 313
CTLA- 4, 655, 689
Cubeta, 716
Cuerpo celular, 159, 159f
Cuerpo de Barr, 469, 469f
Cuerpo medio, 568, 568f
Cuerpo residual, 292
Cuerpos basales, 322, 329, 331f
Cuerpos multivesiculares (MVB, *multivesicular bodies*), 301
Cuerpos P, 507
Cultivo celular, 710-711, 711f
  bidimensional, 710, 711f
  línea celular, 710
  primario, 710
  protoplastos, 710, 711
  secundario, 710
  tridimensional, 710, 711f
Cultivo celular bidimensional, 710, 711f
Cultivo celular primario, 710
Cultivo celular secundario, 710
Cultivo celular tridimensional, 710, 711f
Cultivos poliploides, 389
Currie, A. R., 622
Curva de Kaplan-Meier, 112HPf


## D


Dalton, 5, 23, 23fn
Daptomicina, 102HP
Dasatinib, 75f
Dawson, Martin, 379EP
DCVax, 655
De Duve, Christian, 262
Deaminasa de citosina inducida por activación (AID, *activation induced deaminase*), 683
Defensinas, 664
Deficiencia de adhesión de leucocitos (LAD, *leukocyte adhesion deficiency*), 242HP
Deficiencia de vitamina C, 226, capítulo 7
Degeneración macular relacionada con la edad (AMD, *age-related macular degeneration*), 401HP, 433HP
Degeneración macular, 19-20HP, 401HP, 433HP
Degradación asociada a ER (ERAD, *ER-associated degradation*), 275
Degradación mediada sin sentido (NMD, *nonsense-mediated decay*), 448-449
Delbrück, Max, 513
Deleciones, 479HP
Demencia, 62HP, 65HP, 66HP, 67HP
Dendritas, 159, 159f
Densidad de carga, 715
Desarrollo embrionario
  cadherinas en, 239-240, 240f
  cambios durante la formación celular, 362, 363f
Desarrollo, cilio en, 333-334HP, 334HPf
Desastre nuclear de Fukushima Daiishi, 220HP
Desaturasas, 131
Desenrollando, 517-518, 517f
Desensamblaje, 339-340, 340f
  actina, 339-340, 340f
  filamentos intermedios, 335-336, 336f
Desensibilización, 589
Desequilibrio dinámico, 89
Deshidrogenasa, 105
Desintoxicación en hígado, 267
Desmocolinas, 244
Desmogleínas, 244
Desmosomas, 244-245, 245f
Desmotúbulo, 251
Desnaturalización, 60, 61f, 382, 383-384
Desnaturalización térmica, 383-384, 384f
Desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization*), 717

Desoxiadenosina, 373fn
Desoxicitidina, 373fn
Desoxiguanosina, 373fn
Desoxirribonucleótidos trifosfatos, 373fn, 518, 633EP
dATP, 373fn, 374f, 518, 729f
dCTP, 373fn, 518, 729, 729f, 732f
dGTP, 373fn, 518, 729f, 732f
dTTP, 373fn, 518, 729f
Desoxirribosa, 373
Desoxitimidina, 373fn
Despolarización, 160-162, 161f, 162f, 164, 164f, 165
Despolarización subumbral, 251EP
Destrucción celular, 621-624
apoptosis, 621-624
necroptosis, 624
Determinante antigénico (epítopo), 680
D-fructosa, 42f
D-gliceraldehído, 42, 43f
D-glucosa, 42, 42f
Diabetes
hemoglobina $A_{1c}$ y, 42
tipo 1, 613, 669HP
tipo 2, 613
Diabetes insípida nefrogénica congénita, 142
Diabetes tipo 1 (T1D, *type 1 diabetes*), 669HP
Diabetes tipo 2, 613
Diacilglicerol (DAG, *diacylglycerol*), 47, 597f, 598
Diacinesis, 574f, 576
Diagrama de hidropatía, 128, 128f
Diagrama Lineweaver-Burk, 98, 98f
Diarrea, ósmosis y, 142
Dicer, 431, 472f
Didesoxirribonucleótido trifosfato (ddNTP, *dideoxyribonucleoside triphosphates*), 729-730, 729f
Diener, T. O., 25
Dieta restringida en calorías, esperanza de vida y, 632
Dieta, cáncer y, 632
Dietilaminoetil celulosa (DEAE, *diethylaminoethyl*), 712
Diferenciación de células sanguíneas, 666f
Diferenciación, 15-16, 16f
en la gametogénesis, 572, 573f
inhibidores de la Cdk en, 552
Difosfato de adenosina (ADP, *adenosine diphosphate*)
ATP hidrolizado a, 86-87, 87f
concentraciones en estado de equilibrio de, 89, 89f
en el complejo enzima-sustrato, 92, 93f
en la producción de ATP en la glucólisis, 105-108, 106f, 107f
en reacciones endergónicas, 88
energía libre requerida para convertir ADP a ATP, 104
Difosfato de desoxiguanosina (dGDP, *deoxyguanosine diphosphate*), 373fn
Difracción de rayos X, 717-719, 717f
de los mecanismos de reacción, 95-96
de mioglobina, 55f, 56, 97f
Difusión celular, 234, 234f
Difusión, 21
a través de la bicapa lipídica, 140-143
cambio de energía libre por, de un electrólito en la célula, 140
de iones a través de membranas, 143-147 (*Véase también* Canales iónicos)
de iones de potasio fuera de una célula, 140
de las proteínas de membrana después de la fusión celular, 133, 133f
de sustancias a través de membranas, 140-141
definido, 139
del agua a través de membranas, 141-142, 141f, 142f
energética de, 139-140
facilitada, 151-152, 152f
tasas de proteínas de membrana, midiendo por FRAP, 133-134, 134f
Difusión de sombras, 705, 705f
Difusión facilitada, 151-152, 152f
Difusión parcial, 306
Dímero de clorofila, 207
Dímeros
histona, 530, 531f
pirimidina, 532
timidina, 535
Dímeros de GTP, 325, 326f
Dímeros de la histona, 530, 531f
Dímeros de pirimidina, 532
Dímeros de timidina, 535
Dinamina, 296, 296f
Dineína, 317-319, 318f
Dineína citoplasmática, 317-319, 318f
Dinucleótido adenina nicotinamida (NAD/NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*)
Dióxido de carbono ($CO_2$)
calentamiento global y, 219-220HP
conversión a carbohidratos, 213-215, 214f
en el metabolismo fotosintético, 202-203, 203f
en la fotofosforilación, 212-213
en la fotorrespiración, 216-217, 216f
en la fotosíntesis, resumen de, 200, 215f
en plantas $C_3$, 213-215, 214f
en plantas $C_4$, 218-219, 218f
en plantas CAM, 219
liberación, medición cinética de, 209, 209f
Diploide, 389
Diploteno, 574f, 575-576
Diseño de medicamentos basado en estructuras, 75-76
Dislocación, 275
Disociación, 38
Disolución de cristal de sal, 35, 35f
Dispositivo de carga acoplada (CCD, *charge-coupled device*), 696
Distrofia muscular, 139, 338, 353, 449, 461
Divergencia, en vías de señalización celular, 618, 618f
División celular, 539-581
ciclo celular, 540-552
citocinesis, 552
definido, 540
en células eucariotas, 10, 12, 12f
meiosis, 571-580
mitosis, 552-571
División celular asimétrica, 541
División de genes, 420-423, 429
DNA, 77-78, 77f
amplificación enzimática de, por PCR, 726-728
para clonación o análisis, 728
para comparar moléculas de DNA, 728
para cuantificar modelos de DNA o RNA,728
para probar la presencia de secuencias específicas de DNA, 728
bibliotecas, 730-732
cDNA, 731-732, 732f
genómica, 731
cDNA, 485, 486f
chip de DNA, 485-487, 486f
clonación, 724-726, 725f
DNA eucariotas en genomas de fagos, 726, 726f
DNAs eucariotas en plásmidos bacterianos, 725-726, 725f
PCR en, 728
sintetizando cDNA para, en plásmido, 731-732, 731f
vectores en, 724, 731, 736-737
como material genético, evidencia de, 405-406
composición de base, 374
de cadena sencilla, 384, 385f, 386f, 421, 422f, 518, 521, 521f, 528, 529, 530f, 550, 579, 722
de doble cadena, 377, 384f, 385f, 393f, 421, 422f, 423, 435, 456, 460, 513, 518, 524f, 669HP, 721, 723, 726, 728, 729-730, 735
desnaturalización, 382, 383-384
doble hélice, 375, 376f, 377, 382, 384
edición y silenciamiento de genes, 734-738
epigenética, 480
estructura de, 373-377, 374f
fragmentación de, 723, 731
funciones de, 375, 376, 376f
infraenrollado, 381, 382f
mutaciones en, 27EP
nucleótido, 373, 373fn, 374, 374f
pirimidinas, 373
propuesta de Watson-Crick, 374-377
purinas, 373
rDNA, 413
recombinante (*Véase* DNA recombinante)
renaturalización, 384-387, 384f
secuenciación, 728-730, 729f
separación de, mediante electroforesis en gel, 719, 720f

síntesis química de, 722-723
sitios involucrados en la regulación de la transcripción, 492-494, 492f, 493f
superenrollado, 381-382, 382f
transferencia a células eucariotas y embriones de mamíferos, 732-734
animales transgénicos, 733-734, 733f
plantas transgénicas, 734, 734f
virus oncogénicos, 633-635EP
DnaA, 521, 529t
DnaB, 521, 527, 529t
DnaC, 521, 529t
DNA complementarios (cDNA, *complementary DNA*), 485, 486f
DNA de cadena sencilla, 384, 385f, 386f, 421, 422f, 518, 521, 521f, 528, 529, 530f, 550, 579, 722
DNA de doble cadena, 377, 384f, 385f, 393f, 421, 422f, 423, 435, 456, 460, 513, 518, 524f, 669HP, 721, 723, 726, 728, 729-730, 735
DNA eucariotas en genomas de fagos, 726, 726f
DNA eucariotas en plásmidos bacterianos, 725-726, 725f
endonucleasas de restricción, 723, 724f
formación de, 723-724, 725f
DNA girasa, 517f, 518, 529t
DNA glucosilasa, 532-534, 534f
DNA ligasa, 520, 520f, 529t
DNA metiltransferasas, 500
DNA microsatélite, 385-386
DNA minisatélites, 385
DNA mitocondrial (mtDNA, *mitochondrial DNA*), 195-196HP, 196f, 397-398
DNA polimerasas, 523-526
actividad de, 519f
exonucleasa, 523, 525f
modelos y no modelos para, 518, 518f
cargador de pinza, 523, 524f
estructura y funciones de, 523-526, 523f, 524f
garantía de alta fidelidad, 523-526, 525f
actividades de exonucleasas, 523, 525f
exonucleasas $3' \rightarrow 5'$ de, activación de, 524-525, 525f
holoenzima III, 523, 523f
pares de bases, adecuados y no coincidentes, 524-526, 525f
propiedades de, 518-519, 518f, 519f
DNA polimerasas I, 518, 523, 525, 525f
DNA polimerasas $\alpha$, 529, 529f
DNA polimerasas $\beta$, 529, 529f, 534
DNA polimerasas $\gamma$, 529
DNA polimerasas $\delta$, 529, 529f, 530, 533f, 535
DNA polimerasas $\varepsilon$, 529, 530, 533f, 535
DNA polimerasas $\eta$, 535
DNA recombinante, 723-726
clonación de DNA, 724-726, 725f
DNA satélite A, 477
DNA satélites, 385, 386f
DNasa activada por caspasa (CAD, *caspase activated DNase*), 622
Doble hélice, 375, 376f, 377, 382, 384
Doble hélice complementaria, 375
Dodecil sulfato de sodio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*), 137
electroforesis en gel de poliacrilamida y, 716
Dogma central, 407, 633EP
Doherty, Peter, 672EP
Dolicol fosfato, 274
Dolly (oveja clonada), 483, 484f
Dominio archaea, 13-14, 28-29EP, 28EPf, 28EPn
Dominio de activación, 489
Dominio de bacterias, 13-14, 27EPf, 28EP, 28EPf, 28EPn
Dominio de detección de voltaje, 145, 146f
Dominio de la muerte, 622
Dominio de orientación estroma, 306
Dominio de poro, 145, 146f
Dominio de transferencia del tilacoide, 306-307
Dominio de unión a fosfotirosina (PTB, *phosphotyrosine-binding*), 604-606, 605f, 606f, 612
Dominio de unión al DNA, 489
Dominio PH, 597, 598, 612, 612f
Dominio SH3, 60, 60f, 72, 73f
Dominios
célula procariota, 13-14
de hélices en subunidades de canal Kv, 145, 146f
de la vida, 28EPf
detección de voltaje, en subunidades de canales iónicos 145, 146f
esquemas taxonómicos, 27EP, 28EP
membrana
polaridad celular y, 136, 136f
transmembrana, 127-128, 127f, 128f
poro, en subunidades de canales iónicos, 145, 146f
proteína, 57-58, 57f
SH3, 60, 60f, 72, 73f
Dominios de asociación topológica (TAD, *topologically associated domains*), 481
Dominios de proteínas, 57-58, 57f
Dominios transmembrana, 127-128, 127f, 128f
Don Cassel y Zvi Selinger, 591EP, 592EP
Doudna, Jennifer, 693, 737
Dreyer, William, 681
Driesch, Hans, 6
Drones, 552
*Drosophila*, 16, 17f, 370-373, 370f, 663-664, 737
Duplicación del genoma completo, 389-390
Duplicación genética, 390, 390f
Duplicación, 389-391, 479HP
de secuencias de DNA, 390, 390f
genes de globina, evolución de, 390-391, 391f
poliploidización, 389-390

## E

*E. faecium*, 101HP, 102HP
Ecuación de Nernst, 160, 160fn
Edición de RNA, 504
Edición, gen, 734-738
ingeniería de nucleasas en, 737-738, 738f
interferencia de RNA, 736-737, 737f
mutagénesis *in vitro*, 735
ratones *knockout*, 735-736, 736f
Edidin, Michael, 133
Efector, 584
Eflujo, 139, 140, 160
Eicosanoides, 586
EIF$\alpha$, 275
Ejercicio en el metabolismo aeróbico, función de, 177-178HP
Electroforesis bidimensional en gel, 716, 716f
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) 137, 138f, 148EP, 149EPf, 715-716, 715f
caracterización de proteínas por, 715-716, 715f
electroforesis bidimensional en gel, 716, 716f
SDS-PAGE, 716
Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDSPAGE, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*), 148EP, 149EPf, 297EP, 593EP
Electroforesis en gel. *Véase también* Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)
bidimensional, 716, 716f
separación de los DNA por, 719, 720f
Electroforesis, 715. *Véase también* Electroforesis en gel de poliacrilamida (*PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis*)
Electrones de alta energía, 200, 200fn, 203f
Electrones de baja energía, 200, 203f
Electrones en el fotosistema II, 207-210, 208f
aceptor primario de electrones, 207
flujo de electrones de PSII a la plastoquinona, 207, 208, 209f
flujo de electrones del agua al PSII, 208-210, 209f
Electroporación, 733
Elemento de respuesta a cAMP (CRE, *cAMP response element*), 600, 601f
Elemento de respuesta a glucocorticoide (GRE, *glucocorticoid response element*), 494, 495f
Elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE, *interferon-stimulated response element*), 690-691
Elementos de respuesta, 494
Elementos distales al promotor, 495
Elementos transponibles, 391-392
Embarazo, inmunidad basada en IgG, 680-681

Embriones de erizo de mar, MPF en, 544-545EP, 545EPf
Embriones de mamíferos, transferencia de DNA en, 732-734
animales transgénicos, 733-734, 733f
plantas transgénicas, 734, 734f
Emerson, Robert, 205
Empalme alternativo, 395
Empalme de RNA, 429
Enanismo, 227, 536HP
Enantiómeros. *Véase* Estereoisomerismo
Encefalomielitis alérgica experimental, 669HP
Encefalopatía espongiforme, 63HP
Endocannabinoides, 165
Endocitosis, 293-296
fosfoinosítidos en la regulación de vesículas recubiertas, 296, 297f
mediado por receptor, 294-296, 294f, 297-299EP
Endocitosis a granel, 293
Endocitosis mediada por receptor (RME, *receptor-mediated endocytosis*), 293-296, 294f, 297-299EP
Endomembranas, estudio de, 260-265
autorradiografía, 260, 261f
fenotipos mutantes, 263-264, 264f
fracciones subcelulares, análisis de, 262, 263f
interferencia de RNA (RNAi), 265, 265f
proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*), 260, 261, 262f
sistemas libres de células, 263, 264f
Endonucleasa
AP, 533-534
Dicer, 472f
DNasa activada por caspasa, 622
en el procesamiento de mRNA eucariotas, 424,424f
en interferencia de RNA, 431f
en secuencia *Alu*, 393
FEN-1, 529, 529f
ribonucleasa P, 416
Zucchini, 435
Endonucleasa AP, 533-534
Endonucleasas de restricción, 723, 724f
Endosomas, 300
Endosomas tardíos, 300
Endosomas tempranos, 300
Energética
de cotransportador $Na^+$/glucosa, 155
de difusión, 139-140
de filamento deslizante, 349-350, 349f
de la fotosíntesis, 203, 203f, 206, 206f
del movimiento del soluto, 139-140, 139f. (*Véase también* Difusión)
Energía. *Véase también* Metabolismo
acoplamiento de las reacciones endergónicas y exergónicas, 88
adquirida y utilizada por las células, 5-6, 6f
cambio en interno, 83, 83f
definido, 82
enlaces covalentes, 32-34
entropía, 83-84, 84f
equilibrio *versus* metabolismo en estado estacionario,88-89
libre, 85-88
reacciones endotérmicas, 83
reacciones exotérmicas, 83
reduciendo la potencia, 109
transformaciones espontáneas de, 85-87
Energía de activación (*EA*, *activation energy)*, 90-92, 91f, 92f
Energía de excitación, 205-206, 206f
Energía nuclear, 220HP
Enfermedad cerebrovascular, 233, 241HP
Enfermedad de Alzheimer (AD, *Alzheimer's disease*), 64-67HP, 64HPf, 165
Enfermedad de células I, 287-288HP
Enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD, *Creutzfeld-Jakob disease*), 62-64HP
Enfermedad de Gaucher, 287-288HP
Enfermedad de Graves, 669HP
Enfermedad de Huntington, 433HP
Enfermedad de las vacas locas, 63HP
Enfermedad de Parkinson (PD, *Parkinson's disease*), 195-196HP
Enfermedad de Sandhoff, 287HPt
Enfermedad de Tay-Sachs, 287HPt, 288HP
Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, *inflammatory bowel disease*), 631, 669 HP
Enfermedad Niemann-Pick tipo C, 287HPt, 288HP, 302
Enfermedad periodontal, 243HP
Enfermedades ampollosas, 237, 245, 338, 671
Enfermedades autoinmunes, 668-671HP
artritis reumatoide, 669HP
diabetes tipo 1 (T1D), 669HP
enfermedad de Graves y tiroiditis, 669HP
enfermedades inflamatorias del intestino (IBD, *inflammatory bowel diseases*), 669HP
esclerosis múltiple (MS, *multiple sclerosis*), 669HP
lupus eritematoso sistémico (SLE, *systemic lupus erythematosus*), 669 HP, 669HPf
tratamiento de, 670-671HP
Enfermedades congénitas de glucosilación (CDG, *congenital diseases of glycosilation*), 274
Enfermedades por almacenamiento de esfingolípidos, 287HP, 287HPt
Enfermedades renales poliquísticas (PKD, *polycystic kidney diseases*), 334HP, 334HPf
Enfermedades/trastornos
autoinmunes, 668-671HP
cilio en, 333-334HP, 334HPf
genéticos
cáncer como, 636-638
vinculados a cadherinas, 240, 241f
heredados
defectos en canales iónicos y transportadores como causa de, 157-158HP, 158HPt
mutaciones responsables de, 62, 64HP, 66HP, 67HP
Enfermedades/trastornos genéticos
cáncer como, 636-638
vinculado a cadherinas, 240, 241f
Enfermedades y trastornos hereditarios
defectos en canales iónicos y transportadores como causa de, 157-158HP, 158HPt
mutaciones responsables de, 62, 64HP, 66HP, 67HP
Enfoque isoeléctrico, 716
Engelmann, T., 201
Enlace nexina, 329, 330f, 332
Enlaces amida, 40
Enlaces covalentes, 32-34
Enlaces de hidrógeno, 35-36, 36f, 37f
mapa de densidad electrónica de, 96, 96f
Enlaces éster, 40
Enlaces fosfodiéster, 77f, 78, 373, 374f
Enlaces glucosídicos, 43-44, 43f, 44f
Enlaces iónicos, 35, 35f, 36f
Enlaces no covalentes, 35-38
enlaces de hidrógeno, 35-36, 36f, 37f
enlaces iónicos, 35, 35f, 36f
interacciones hidrofóbicas, 36, 37f
propiedades de soporte vital del agua, 37-38, 38f
fuerza de Van der Waals, 36-37, 37f
Enlaces peptídicos, 49, 49f, 445, 446
Enlazador de Histona, 465
Ensamblaje
actina, 339-340, 340f
filamentos intermedios, 335-336, 336f
Ensayo, 712
Entalpía, 85, 85f
Entrada de calcio operada por depósito (SOCE, *store-operated calcium entry*), 615, 616f
Entrecruzamiento, 371, 371f, 372f. *Véase también* Recombinación genética
desigual, 390, 390f
durante la meiosis, 579-580, 579f
Entrecruzamiento de proteínas, 353
Entrecruzamiento desigual, 390, 390f
Entropía, 83-84, 84f
cuando el agua se congela, 85, 85f
Envejecimiento
prematuro (progeria), 461, 536HP
radicales y, 34-35HP
síndrome de Down (trisomía 21) y, 479HP
telómeros y, 477
trastornos de mitocondria y, 195HP
Envoltura nuclear, 8f, 9f, 10
complejo de poro nuclear, 462-465, 462f, 463f, 464f
en la meiosis, 574, 575f, 576, 577
en la mitosis, 543EP, 544EP, 558, 559f, 567
estructura de, 460-465, 460f, 461f
transporte de RNA, 465
Enzima convertidora de angiotensina (ACE, *angiotensin converting enzyme*), 99
Enzima estática, 190
Enzima Kornberg, 518

Enzimas. *Véase también* Sustratos
actividad catalítica, 90, 91t, 93-96
cambio de la reactividad del sustrato, 94, 95f
inducción de tensión en el sustrato, 94-96, 95f
orientación del sustrato, 94, 94f
actividad cinética, 97-100
inhibidores enzimáticos, 98-100, 99f, 100f
modelo de Michaelis-Menten, 97-98
actividad en la regulación metabólica, alteración, 109-110
alteración de la actividad
por modificación covalente, 109-110
por modulación alostérica, 110
barrera de la energía de activación, superación, 90-92, 91f, 92f
como catalizadores biológicos, 89-93
definido, 6, 90
del metabolismo, 6, 29EP
en la reprogramación celular directa, 21HP
especificidad de, 90, 93
inhibidores, 98-100, 99f, 100f
inhibición no competitiva, 99-100, 100f
inhibidores competitivos, 99, 99f, 100f
inhibidores irreversibles, 98-99
propiedades de, 90
restricción, 723, 724f
sitio activo de, 92-93, 93f
terapia de reemplazo, 287HP
transcripción, en células eucariotas, 411, 412t
Enzimas de RNA, 78
Enzimas lisosomales
clasificación y transporte de, 285-286, 285f
muestreo de, 291t
Enzimas metabólicas, oncogenes que codifican, 647-648
Epidemiólogos, 631
Epidermólisis bullosa, 237
Epigenética, 480
Epigenomas, 480
Epinefrina, 587t, 590-592EP, 591EPf, 591EPt, 595, 599, 600, 601, 601f, 601t
Epítopo (determinante antigénico), 680
Equilibrio
en acoplamiento de las reacciones endergónicas y exergónicas, 88
en cambio de energía libre, 85-88
enzimas y, 90
glucólisis y, 105, 106f
*versus* metabolismo en estado estacionario, 88-89, 89f
ERGIC (*endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment*), compartimento intermedio del retículo endoplásmico de Golgi, 276
Erikson, Ray, 634EP
Eritroblastosis fetal, 680-681
Eritroleucemias, 635EP
Errores innatos del metabolismo, 405
Escaneos PET (*positron emission tomography*), tomografía por emisión de positrones, 66HPf
*Escherichia coli*, 13, 16, 17f, 22, 29EP, 59
Escilo-inositol, 66
Esclerosis múltiple (MS, *multiple sclerosis*), 162, 669 HP
Escorbuto, 226
Esfingolípidos, 119-120, 119f
Espacio intermembrana, 170
Espacio luminal (cisternal), 265
Especies de oxígeno reactivo (ROS, *reactive oxygen species*), 195HP
Especificidad, 49
célula huésped, de virus, 24
de enzimas, 90, 93
de los GPCR, 599
Especificidad de los virus de la célula huésped, cambio en, 24
Espectrina, 137, 138f, 139
Espectro de absorción, 204, 205f
Espectro de acción, 205, 205f
Espectrofotómetro, 716
Espectrometría de centelleo líquido, 709
Espectrometría de masas, 716-717, 717f
proteínas identificadas por, 71-72, 71f
Espectrometría de masas TAP-tag, 72
Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR, *electron paramagnetic resonance*), 129, 130f
Espectroscopía por resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*), 55, 56f, 58, 60, 63HPf, 129
Espermátidas, 572, 573f
Espermatocitos primarios, 572
Espermatocitos secundarios, 577
Espermatogonias, 572, 573f
Espermatozoide, 572
Espliceosoma, 426
Esporofito, 572, 573, 573f
Esporogénesis, 572, 573, 573f
Esqueleto, membrana, 137, 138f, 139
Estado de transición, 92
Estado excitado, 204
Estado fundamental, 204
Estado nativo, 60
Estatinas, 302
Estereoisomerismo, 42-43
de aminoácidos, 49, 49f
de gliceraldehído, 42-43, 43f
Ésteres de forbol, 598
Esteroides
colesterol, 47
como portador extracelular, 586
estructura de, 47, 47f
Estímulos, respuesta a, 6-7, 7f, 116
Estrógeno, 47, 47f, 632
Estroma, 202
Estroma corneal, 227f
Estromatolitos, 31
Estructura cuaternaria de las proteínas, 58-60, 59f
hemoglobina, estructura de, 59, 59f
interacciones proteína-proteína, 59-60, 59f, 60f
Estructura en lazo, 426
Estructura nuclear, replicación y, 530, 530f
Estructura secundaria de proteínas, 53-54, 54f
Estructura terciaria de las proteínas, 55-58
cambios dinámicos con proteínas, 58, 58f
dominios de proteínas, 57-58, 57f
mioglobina, 55f, 56, 57f
similitudes entre las proteínas reveladas por, 56-57, 57f
Estructuras macromoleculares, 79
partículas del virus del mosaico del tabaco, ensamblaje de 79
subunidades ribosomales, ensamblaje de, 78, 79, 79f
Estudio doble ciego, 65
Estudios de asociación del genoma completo (GWAS, *genome-wide association studies*), 400-401HP
Etiquetas de glutatión-*S*-transferasa (GST, *glutathione-S transferase*), 713
Eubacteria. *Véase* Dominio de bacterias
Eucariota, 28EP, 28EPf
Eucariotas, 8-13, 15-17
características que distinguen, 8-9f, 8-13
célula única (unicelular), 15-16, 15f
células procariotas en comparación con, 9-13, 10t
citoplasma de, 10, 12f
división celular en, 10, 12, 12f
estructura de, 10, 11f
flagelo, 12, 13, 13f
inicio de la traducción en, 443-444, 443f
membranas plasmáticas de, carbohidratos en, 122
organismos modelo, 16, 17f
origen de, 26-29EP, 26EPf
procesamiento del RNA en, 411-412, 412f
regulación génica en, resumen de, 483-484, 484f
replicación del DNA en, 526-530
demostración experimental de, 527, 527f
estructura nuclear y, 530, 530f
horquillas de replicación, 528, 529-530, 529f
inicio de, 526-527
restricción a una vez por ciclo celular, 527-528, 528f
tipos de, 15-16
transcripción de enzimas en, 411, 412t
transcripción en, 410-412, 412f
transferencia de DNA en, 732-734
animales transgénicos, 733-734, 733f
plantas transgénicas, 734, 734f
Eucromatina, 469
*Euglena*, 27EP, 27EPn
Evans, Martin, 735
Eventos espontáneos, 83
Eventos estocásticos, 5
Evolución
de células, 7, 17f

desaparición de la mitocondria durante, 27EPn
Excitación sexual, 620
Exocitosis, 290-291
Exoma, 367, 399
Exones, 420
Exonucleasa, 524-525, 525f
Expansinas, 255
Expansión clonal, 689
Experimento de Meselson-Stahl, 513-515, 515f
Experimentos de Hershey-Chase, 380EP, 381EPf
Expresión génica, 406
  aberraciones cromosómicas y trastornos humanos, 478-479HP
  activación transcripcional (*Véase* Activación transcripcional)
  actividad genética, perfilando, 485-488
  control de procesamiento del RNA, 503-504
  control postraduccional, determinación de la estabilidad de la proteína, 509-510
  control traslacional, 505-508
  cromosoma mitótico, estructura de, 473-478
  en bacterias, control de, 456-460
  envoltura nuclear, estructura de, 460-465
  epigenética, 480
  eucariotas, resumen de la regulación génica en, 483-484
  factores de transcripción (*Véase* Factores de transcripción)
  genoma eucariota, embalaje de, 465-469
  heterocromatina, 469-473
  núcleo como organelo organizado, 480-483
  represión transcripcional, 400f, 499-502
  transcripción, sitios del DNA implicados en la regulación, 492-494
Extensión lamelipodial, 356, 356f
Extremadamente resistente a los medicamentos (XDR, e*xtremely drug resistant*), 100HP
Extremo 3′ (extremo tres-prima), 374, 374f
Extremófilos, 13

## F

F-actina. *Véase* Filamentos de actina
F pilus, 12f
Factor activador de plaquetas (PAF, *platelet activating factor*), 242HP
Factor de acoplamiento 1 (F1), 188
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*), 604, 609, 618f, 619f, 646
Factor de crecimiento epidérmico (EGF, e*pidermal growth factor*), 604, 609, 618f, 619f
Factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), 622, 623f, 676
Factor de transcripción HIF, 630
Factor promotor de maduración (MPF, *maturation-promoting factor*)
  descubrimiento y caracterización de, 543-546EP
    en células de mamíferos, 544EP, 544EPf
    en embriones de erizo de mar, 544-545EP, 545EPf
    estudio utilizando anticuerpos contra levadura cdc2, 546EP
    maduración de ovocitos, 544EP, 544EPf, 576
    niveles de ciclina, 545EP, 545EPf, 546EP
    purificación de, 545-546EP
  entrada de una célula en la mitosis y, 542
Factor sigma (σ), 411
Factor Xa, 93f
Factores asociados a TBP (TAF, *TBP-associated factors*), 418f
Factores de crecimiento, oncogenes que codifican, 646-647
Factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, *guanine nucleotide-exchange factors*), 608
Factores de transcripción, 408, 677fn, 690-691
  en la regulación de la expresión génica, 488-489, 488f, 489f
  estructura de, 489-491, 490f
  motivo cremallera de leucina, 491
  motivo dedo de zinc, 490, 490f
  motivo hélice-espiral-hélice, 490-491, 491f
  oncogén que codifica, 647
Fagocitosis, 293, 303-304, 303f
Fagoforo, 292, 292f
Fagolisosoma, 303
Fago-pantalla, 740
Fagosoma, 303
FAK (*focal adhesión kinase*), cinasa de adhesión focal, 233, 235, 235f
Familia de chaperonas Hsp60, 68EP
Familia del citocromo P450, 267
Familia WASP/WAVE, 354
Familias (o superfamilias) de moléculas, 76
Fantasmas de eritrocitos, 137, 138f
Fantasmas, eritrocitos, 137, 138f
Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), 631
Fase M. *Véase* Mitosis
Fase S, 541
Fawcett, Dan, 329
FEN-1, 529, 529f, 529t
Fenotipo mutante, 649
Fenotipos mutantes, 263-264, 264f
Fermentación, 108, 108f
Fernández-Morán, Humberto, 188
Ferredoxina, 211
Fibra muscular, 346, 346f
Fibroblasto de ratón, micrografía electrónica de, 354, 354f
Fibroblastos
  fuerzas de tracción en la migración, distribución de, 357, 357f
  micrografía electrónica del ratón, 354, 354f
Fibronectina, 229, 230f, 231f
Fibrosis quística (CF, *cystic fibrosis*), 157-158HP, 157HPf, 275, 449
Fidelidad durante la replicación del DNA, 523-526, 525f
Fiebre Q, 303-304
Fields, Stanley, 714
Fijación de nitrógeno, 14
Fijador, 695
Filamento deslizante, energética de, 349-350, 349f
Filamento ParM, 362, 363f, 364, 364f
Filamentos
  actina (*Véase* Filamentos de actina)
  delgado, 346, 347f
  grueso, 346, 347f
  intermedio (*Véase* Filamentos intermedios)
  microtúbulos (*Véase* Microtúbulos)
  modelo de filamento deslizante de la contracción muscular, 346, 347f, 348-351
Filamentos de actina, 338-344. *Véanse también* Proteínas de unión a actinas; Miosina
  adaptación de, en células, 351, 351f
  ensamblaje y desensamblaje, 339-340, 340f
  estructura, 338-339, 339f
  motilidad basada en actina sin células, 358-360EP, 359EPf, 360EPf
  movimiento por lamelipodio de los queratocitos de peces, 357, 357f, 358
  polaridad de, determinante, 338, 339f
  polimerización, 339, 340f, 354, 355f, 356, 358EP, 359EP, 359EPf
  procesos dependientes de la actina durante el desarrollo, 361-362 (*Véase también* Crecimiento axonal)
  propiedades de, 310t
  resumen de, 310, 311f, 338
Filamentos finos, 346, 347f
Filamentos gruesos, 346, 347f
Filamentos intermedios, 335-338
  ensamblaje y desensamblaje, 335-336, 336f
  propiedades de, 310t, 335t
  puentes cruzados de proteínas, 335, 335f
  resumen de, 310, 311f, 335
  tipos y funciones de, 336-338, 337f
Filoquinona, 210
Filtro de selectividad, 144-145, 144f, 145fn, 151EPf
Fingolimod, 671HP
Fire, Andrew, 430
Fisión, mitocondrial, 169, 170f
Flagelo, 8f, 9f, 12, 13, 13f, 327-333, 329f
  axonema, 329-331, 330f, 331f
  estructura de, 329-331, 329f

locomoción, mecanismo de, 331-333, 332f, 333f
resumen de, 327, 329
transporte intraflagelar, 331, 332f
Flavell, Richard, 420
Flavoproteínas, 180, 181f
Flemming, Walther, 552
Flipasas, 132, 272
Fluidez de la membrana
balsas de lípidos, 131-132, 132f
importancia de, 131
mantenimiento, 131
Fluidez, membrana. *Véase* Fluidez de la membrana
Flujo, 139, 140, 160, 161f, 164, 164f, 165
Flujo de microtúbulos, 560f, 565f
Flujo neto, 139, 151
Fluorescencia, 696
Fluorescencia de doble etiqueta, 697, 698f
Fluoróforos, 696
Flurizan, 66HP
Focos de replicación, 530, 530f
Folkman, Judah, 659
Folleto, 117
cadenas de acil graso, 120
composición de lípidos en, 118f, 120f, 121-122
de balsas de lípidos, 132f
glucolípidos en, 122
movimiento de fosfolípidos a través, 132, 133f
proteínas de membrana ancladas a lípidos en, 125
replicación de fractura por congelación, 124, 125f
Formación de ATP
coenzimas reducidas en, 175-177, 176f, 177f
experimento para conducir, 188, 188f
fosforilación oxidativa en, 178-182
portadores de electrones, 180-182, 181f
potenciales de oxidación-reducción, 179-180, 179f, 179t
transporte de electrones, 180
mecanismo de cambio de unión, 189-192
componentes de, 189-190
evidencia en apoyo, catálisis rotatoria y, 190-192, 191f, 192f
Formación de placa aterosclerótica, 302, 302f
Fosfatasa Cdc25, 547, 548, 548f, 550-551, 551f
Fosfatidilcolina (PC, *phosphatidylcholine*), 119, 119f, 120, 121-122, 121t, 122f, 130, 130f, 132f
Fosfatidiletanolamina (PE, *phosphatidylethanolamine*), 119, 119f, 122, 122f, 130, 130f
Fosfatidilserina (PS, *phosphatidylserine*), 119, 119f, 121t, 122, 122f
Fosfato inorgánico (Pi, *inorganic phosphate*), 87f, 105
Fosfodiesterasa, 620-621
Fosfoenolpiruvato (PEP, *phosphoenolpyruvate*), 93f, 106, 106f,
Fosfoenolpiruvato carboxilasa, 218
Fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*), 492, 492f
Fosfofructocinasa, 110-111, 111f
Fosfoglicerato cinasa, 105
Fosfoglicéridos, 119, 119f
Fosfoinosítidos, 597, 597f
Fosfolipasa C (PLC, *phospholipase C*), 597-598, 597f
diacilglicerol, 597f, 598
inositol 1,4,5-trifosfato, 597f, 598, 598t
Fosfolipasa C-β específica del fosfatidilinositol (PLCβ, *phosphatidylinositol-specific phospholipase C*-β), 598
Fosfolipasas, 131
Fosfolípidos, 119-120, 119f
bicapa lipídica, 117f, 118f, 120, 120f
colesterol en, 120, 120f
distribución asimétrica de, 122f
en bicapa lipídica de membrana, 117f, 118f, 120, 120f
estructura química de, 47-48, 48f
movimiento de, en la membrana plasmática, 132, 133f
Fosforilación a nivel de sustrato, 105-106, 107f
Fosforilación de tirosina, 585, 585f, 606, 607, 611, 612
Fosforilación/desfosforilación de Cdk, 547-548, 548f
Fosforilación oxidativa, 105, 178-182
portadores de electrones, 180-182, 181f
potenciales de oxidación-reducción, 179-180, 179f, 179t, 180fn
transporte de electrones, 180
Fosforilación proteína-tirosina
en la transducción de señales, 603-607
activación de proteína cinasa, 604
dimerización del receptor, 604
interacciones proteína-proteína dependientes de la fosfotirosina, 604
respuesta final, 607
vías de señalización corriente abajo, activación de, 604, 606-607
Fósforos, 709
Fotoautótrofos, 200
Fotofosforilación, 212-213, 213f
Fotofosforilación cíclica, 213
Fotofosforilación no cíclica, 213
Fotoinhibición, 209
Fotólisis, 209
Fotones, 203
Fotorrespiración, 216-217, 216f, 217f
Fotosíntesis, 199-221. *Véase también* Síntesis de carbohidratos
absorción de luz, 203-205, 205f
bacteria verde del azufre, 200, 200f
calentamiento global y secuestro de carbono, 219-220HP
definido, 200
dióxido de carbono en, 200, 215f
energéticos de, 203, 203f, 206, 206f
estructura del cloroplasto, 201-202, 201f
etapas de, 215f
fotofosforilación, 212-213, 213f
fotosistemas en
acción de coordinación de, 205-211
definido, 206
fotosistema I, 207, 210-211, 210f
fotosistema II, 207-210, 208f
metabolismo, 202-203
origen de, 200-201
transporte de electrones, 211-212, 212f
Fotosíntesis oxigénica, 209
Fotosistema I (PSI, *photosystem I*), 207, 210-211, 210f
Fotosistema II (PSII, *photosystem II*), 207-210, 208f
aceptor primario de electrones, 207
de PSII a PSI, 210
flujo de electrones de PSII a la plastoquinona, 207, 208, 209f
flujo de electrones del agua al PSII, 208-210, 209f
obtener electrones por división del agua, 207-210
organización funcional de, 208f
P680, 207, 208f
P700, 207, 210f
Fotosistemas
acción de coordinación 205-211
definido, 206
fotosistema I, 207, 210-211, 210f
fotosistema II, 207-210, 208f
Fox, George, 27EP, 28EP
Fracción altamente repetida, 384-386
Fracción moderadamente repetida, 384, 386, 387
Fracción no repetida, 384, 387, 387f
Fraccionamiento
de ácidos nucleicos, 719-721
separación de, por ultracentrifugación, 719-721, 721f
separación de los DNA por electroforesis en gel, 719, 720f
del contenido de una célula por centrifugación diferencial, 711-712, 711f
Fracciones subcelulares, análisis de, 262, 263f
Fraenkel-Conrat, Heinz, 79
Fragmentación
de DNA, 723, 731
en espectrómetro de masas, 717fn
Fragmentos de Okazaki, 520, 520f, 521-522, 522f, 523, 524f, 528
Fragmoplasto, 571
François Jacob, 406
Fridovich, Irwin, 34HP
Frotis de Papanicolaou, 637, 637f, 660
Fructosa 1,6-bisfosfatasa, 110-111, 111f
Fructosa, 42, 42f
Frye, Larry, 133
FTD, 67HP
Fuerza de Van der Waals, 36-37, 37f
Fuerza motriz de protones (Δp), 186-187, 187f
establecimiento de, 186-187, 187f
otras funciones de, 193, 194f

Fuerzas de tracción en la migración de fibroblastos, distribución de, 357, 357f
Fumar, 148EPfn, 400HP, 631
Función de los lisosomas, trastornos resultantes de defectos en, 286-288HP
Furchgott, Robert, 620
Furshpan, Edwin, 251EP
Fusión celular, 133, 133f
Fusión del DNA, 383-384, 384f
Fusión, mitocondrial, 169, 170f
Fusión vesicular, 264, 264f, 288

## G

G heterotriméricas, 587f, 587t, 589-590, 594 HP, 595HP, 597, 599, 603, 608
Gajdusek, D. Carleton, 63HP
Gall, Joseph, 386
Gameto, 368
Gametofito, 552, 573
Ganglios linfáticos, 231f, 238, 654f, 662, 662f, 671HP, 672EP, 676, 677f, 688, 699
Gas de efecto invernadero, 219-220HP. *Véase también* Dióxido de carbono ($CO_2$)
Gas nervioso, 98, 114, 115, 165
Gases como portador extracelular, 586
Gases inertes, 33f
Gay, Leslie, 379EP
Gelles, J., 320EP
*Gemmata obscuriglobus*, 26EP, 27EPf
Gen *AIRE*, 686
Gen *AMY*1, 397, 398F
Gen *ATM*, 550
Gen *BCL-2*, 648, 648f
Gen *BRAF*, 646fn, 647, 649, 657, 657f
Gen *BRCA1*
  cáncer de mama y, 512, 645
  pruebas genéticas, 512
Gen *BRCA2*, 645
Gen celular *src* (c-src, *celular src gene*), 634EP
Gen *CFH*, 401HP
Gen *CSA*, 536HP
Gen *CSB*, 536HP
Gen de β-globina, 721
Gen de la amilasa, 397-398, 398f
Gen de la ovoalbúmina, 417
  intrones en, visualización, 422, 423f
Gen del virus de la estomatitis vesicular (VSVG, *vesicular stomatitis virus gene*), 261, 262f, 276f, 280, 280f
Gen *FOXP2*, 397, 398
Gen *FOXP3*, 678
Gen *GFP*, 697
Gen *GREB1*, 481
Gen *INK4a*, 644
Gen *Klf4*, 20HP
Gen *KRAS*, 646fn, 650-651, 650f, 658
Gen *Lin-4*, 433-434
Gen *MYC*, 20HP, 647
Gen Oct4, 20HP
Gen PRNP, 63
Gen *PTEN*, 646
Gen *RAS*, 635EP
Gen *RB*, 640-641, 641f
Gen regulador, 457
Gen Sox2, 20HP
Gen *src* viral (v-*src*), 634EP
Gen *SRGAP2*, 397
Gen *TFF1*, 481
Gen Tg737, 334HP
Gen *Toll*, 663-664, 664f
Gen *TP53*, 642-645, 642f. *Véase también* Polipéptido P53
Gen *Wee1*, 547
Gen *XPD*, 536 HP
Gen *XPF*, 536 HP
Genes
  como unidad de herencia, 367-368
  definido, 368
  descubrimientos sobre la naturaleza de, 367f
  división, 420-423
  duplicación de, 390, 390f
  edición y silenciamiento, 734-738
    ingeniería de nucleasas, 737-738, 738f
    interferencia de RNA, 736-737, 737f
    mutagénesis *in vitro*, 735
    ratones *knockout*, 735-736, 736f
  estructura molecular de, mutaciones y, 5
  globinas (*Véase* Genes de las globinas)
  naturaleza química de, 377-381EP
  operón bacteriano para la regulación de, 457, 458f
  perfilando actividad de, 485-488, 485f
    chip de DNA, 485-487, 486f
    pseudogenes, 391
    secuenciación del RNA, 487-488, 487f
Genes *APC*, 645
Genes de las globinas
  β-globina, 721
  evolución de, 390-391, 391f
  intrón en, micrografías electrónicas de, 422f
  intrón en, visualización, 421, 422, 422f
Genes estructurales, 457
Genes OSKM, 20HP
Genes supresores de tumores, 638-646, 638f, 640t
  gen *PTEN*, 646
  gen *RB*, 640-641, 641f
  gen *TP53*, 642-645, 642f
  genes *APC*, 645
  genes *BRCA1*/*BRCA2*, 512, 645
  resumen de, 638-639
Genética
  análisis en *Drosophila*, 370-373, 370f
  base del ser humano, 397-398
  entrecruzamiento, 371, 371f, 372f
  mutagénesis, 371-373, 372f
  variación dentro de la población humana, 398-400
    variación de secuencias de DNA, 398-399
    variación del número de copias, 399-400
    variación estructural, 399, 399f
Genética inversa, 735
Genética prospectiva, 734-735
Genoma del cáncer, 649-651
Genoma eucariota, embalaje de, 465-469
  niveles más altos de estructura de la cromatina, 467-468, 467f, 468f
  nucleosomas, 465-467, 466f
Genoma nuclear de los neandertales, 398
Genomas
  aplicación del análisis genómico en la medicina, 400-403HP
  bacteriana, organización de, 456
  comparaciones, 395f
  comparativo, 396
  complejidad de, 382-387
  de poblaciones africanas, 385-386
  definido, 367
  duplicación, 389-391
  elementos genéticos móviles en la evolución de, 393-394
  naturaleza dinámica de, 391-394
  secuenciación, 394-396
Genomas bacterianos, organización de, 456
Genomas del fago, clonación de DNA eucariotas en, 726, 726f
Genotipo $Rh^+/Rh^-$, 680-681
Gerhart, John, 545EP
Gey, George, 3, 627, 628
Gey, Martha, 3
*Giardia*, 27EPn
Gibbs, J. Willard, 85
Gilman, Alfred, 593EP
Giro, organelo, 291-292
Gleevec, 75, 75f, 76, 99, 656-657, 657f, 659
Glicanos. *Véase* Carbohidratos
Gliceraldehído, 42, 43f
Gliceraldehído 3-fosfato (GAP, *glyceraldehyde-3-phosphate*), 214-215, 214f
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, 105
Glicina, 50, 51f
Glicoforina A, 137, 137f
  cadena polipeptídica de, 127f, 137
  diagrama de hidropatía para, 128, 128f
  estructura bidimensional de, 127, 127f
  hélice α de, 122
Glicosaminoglicanos, 44f, 45-46, 45f
Gliomas, 646, 655, 659. *Véase también* Cáncer de cerebro
Glioxisomas, 195, 195f
Glóbulos rojos. *Véase* Membrana plasmática de eritrocitos
Glucagón, 591EP, 591t, 592EPf, 595-596, 599, 600, 601f, 601t, 611
Glucocálix, 224, 224f
Glucógeno sintasa *cinasa*-3 (GSK-3, *glycogen synthase kinase*), 612-613
Glucógeno y almidón, 44f, 45
Glucolípidos en lípidos de membrana, 118f, 119-120, 119f, 120f, 122, 286-288HP
Glucólisis, 105-108
  catabolismo de glucosa, 104-105

en el metabolismo aeróbico, 172-173, 174f
fermentación y, 108, 108f
pasos de, 105, 106f
perfil de energía libre, en tejido del músculo cardiaco, 106f
producción de ATP en, 105-108
Glucólisis aeróbica, 630
Gluconeogénesis, 110-111, 111f
Glucosa
catabolismo de, 104, 105
en almidón, 44f, 45
en azúcares simples, 42, 42f
en celulosa, 44f, 45
estabilidad de, 90
gluconeogénesis *versus*, 110-111, 111f
Glucosa en sangre
GPCR en regulación de, 599-602, 599f
cAMP en amplificación de señal, 600
cAMP en la movilización, 600, 600f, 601f
respuestas hormonales mediadas por cAMP, 600-602, 601t
vías de transducción de señales cAMP, 600-602, 602f
Glucosilación, 122, 122f
en RER, 273-274, 273f, 274f
Glucosiltransferasas, 273
GLUT4, 612, 612f, 619
Goldfischer, Sidney, 196 HP
Goldstein, Joseph, 297-298EP
Golgi, Camillo, 1, 276
Gorter, E., 117
Grabado por congelación, 706, 707, 707f
Gradiente de pH (ΔpH), 186-187
Gradiente de protones, 192-193
porción de $F_0$ de ATP sintasa en la síntesis de ATP, función de, 192-193, 193f
usando, 192-193
Gradiente electroquímico, 140, 161, 186
Grana, 202
Gránulo de lipofuscina, 292
Gránulos secretores, 259, 261f
Granzimas, 677
Grasa mixta, 46f, 47
Grasa no saturada, 46, 46f
Grasa poliinsaturada, 46
Grasa saturada, 46, 46f
Grasas *trans*, 47
Grasas, 46-47, 46f, 47f
Grendel, F., 117
Griffith, Frederick, 378-379EP
GroE, 67EP
GroEL, 58, 67-70EP, 68EPf, 69EPf, 70EPf
GroES, 58, 67-70EP, 69EPf, 70EPf
Grupo amino, 38, 45, 49, 49f, 50, 52f
Grupo carboxilo, 40, 46, 46f, 49-50, 49f, 52f, 76
Grupo de enlace, 370
Grupos funcionales, 40, 40t
Grupos prostéticos, 180
Guanilil ciclasa, 620
Guanina, 78, 78f
Guanina (G), 373
Gurdon, John, 483

## H

*Haemophilus influenzae* tipo B, 667
*Haloarcula marismortui*, 453EPf
*Halobacterium salinarium*, 155
Hanson, Jean, 348
Haplotipos, 402HP, 402HPf, 672EP
Harden, Arthur, 105
Harman, Denham, 34HP
Harrison, Ross, 361
Hartl, F.-Ulrich, 68EP
Hartwell, Leland, 547, 550
Havell, Ed, 358EP
Hebra líder, 519-520, 519f, 520f
Hebra retardada, 519-520, 519f, 520f
Helicasa, 521-522
Hélice/hélices transmembrana
en bacteriorrodopsina, 155, 155f
en la glicoforina A, 127, 127f
en receptor de acetilcolina, 148HP, 150-151EP, 151EPf
en sitios de unión de cationes, 153f
residuos de aminoácidos en, 128, 128f
Hélice/hélices.
doble hélice, 375, 376f, 377, 382, 384
en subunidades de canales iónicos
dominios de, 145, 146f
subunidades de canal KcsA, 145, 145f
subunidades de canal Kv, 145-146, 146f
transmembrana
en bacteriorrodopsina, 155, 155f
en el receptor acetilcolina, 148HP, 150-151EP, 151EPf
en la glicoforina A, 127, 127f
en sitios de unión de cationes, 153f
residuos de aminoácidos en, 128, 128f
*Helicobacter pylori*, 631
Hell, Stefan, 699-700
Hemicelulosas, 254-255
Hemidesmosomas, 236-237, 236f
Hemofilia, 392
Hemoglobina $A_{1c}$, 42
Hemoglobina, estructura de, 59, 59f
Hemólisis, 137
Hendidura sináptica, 163, 163f, 164, 164f, 165
Hepatosis, 42
HER2, 655
Herceptina, 655
Herencia mendeliana, 195HP, 369, 387, 387 HP, 400HP
Hers, H. G., 287HP
Hershey, Alfred, 380EP
Hertwig, Otto, 378EP
Heterocigotos, 735
Heterocromatina, 469-473, 472f
código de histona y formación de, 470-473, 471f, 472f
como inhibidor de la recombinación genética, 469
constitutiva, 469
facultativa, 469, 469f
inactivación del cromosoma X, 470
Heterocromatina constitutiva, 469
Heterocromatina facultativa, 469, 469f
Heterocromatinización, 470, 472f, 473
Heterodímero, 59, 59f
Heterodúplex, 580
Heteroplasmia, 195HP
Heterótrofos, 200
Heuser, John, 707
Hexosas, 42
Hibridación de ácido nucleico, 721-722, 722f
Hibridación fluorescente *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*), 386, 386f
Hibridación *in situ*, 386
Híbrido, 421
Hibridomas, 739-740
Hidrocefalia, 239, 334HP
Hidrofobicidad, 128, 128f
Hidrogenación, 47
Hidrolasas ácidas, 291
Hidrólisis, 41f
Hidrólisis de ATP, 87, 87f, 88, 111
acople del transporte a, 152-154
ADP en, 86-87, 87f
concentraciones en estado estacionario de, 89, 89f
en reacciones endergónicas, 88
funciones de, 89f
tamaño de paso de la cinesina, 319-320EP
Hidrólisis de GTP, 325-326
Hígado, desintoxicación en, 267
Hipercolesterolemia familiar (FH, *familial hypercholesterolemia*), 297-299EP, 298EPf
Hipermutación somática, 683
Hipertensión, 99
Hipoparatiroidismo, 595HP
Hipótesis “Mundo de RNA”, 405
Hipótesis amiloide, 64-65HP
Hipótesis de la señal, 268
Hipótesis un polipéptido-dos genes, 681
His-tag, 713
Histona acetiltransferasas (HAT, *histone acetyltransferases*), 496
Histona metiltransferasa, 471
Histonas, 465
Histonas desacetilasas (HDAC, *histone deacetylases*), 499
HIV. *Véase* Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, *human immunodeficiency virus*)
HMG CoA, 297EP, 298EPf, 302
HnRNA. *Véase* RNA nuclear heterogéneo (hnRNA)
Hodgkin, Alan, 143, 160
Hoffmann, Jules, 663
Hoja, estructura de, 201, 201f
Hokin, Lowell y Mabel, 597
Holden, Hazel, 349
Holley, Robert, 439
Holliday, Robin, 580
Holmes, Frederick Lawrence, 514fn
Holoenzima DNA polimerasas III, 523, 523f
Homodímero, 59, 59f, 127f, 137
Homogeneizador, 711
Hooke, Robert, 2, 2f
Hoppe-Seyler, Ernst, 377EP, 378EP

Hormona "lucha o huida". *Véase* Epinefrina
Hormona del crecimiento (GH, *growth hormone*), 733
Hormona del crecimiento humano (GH, *human growth hormone*), 75
Hormona estimulante de la tiroides (TSH, *thyroid-stimulating hormone*), 669HP
Hormona paratiroidea, 595HP, 601t
Hormonas
adenilil ciclasa y, 590-593EP, 591EPf, 591EPt
cáncer y, 632
en señalización celular, 583
respuestas mediadas por cAMP, 600-602, 601t
esteroides, 47, 47f
Horquillas de replicación, 517
en células bacterianas, 517
estancada, 535-536, 535fn
eucariota, 528, 529-530, 529f
maquinaria que opera en, 521-522, 521f, 522f
Horvitz, Robert, 622
Horwich, Arthur, 68EP
Howard, Alma, 542f
Huella dactilar del DNA, 385, 385f
Huella del DNA, 493
Huella digital de masa de péptido, 71, 71f
Hunt, Tim, 544EP
Huso central, 570
Huso mitótico, 10, 12, 12f
formación de, 556, 557-558, 557f, 558f
Huso mitótico bipolar, 557
Huxley, Andrew, 160, 348
Huxley, Hugh, 348

## I

Icosaedro, 23, 24f
Ignarro, Louis, 620
Impresión genómica, 501-502
Impreso, 501
*In vitro*, 3, 18HP, 21HP
*In vivo*, ciclos celulares en, 541-542
Inactivación del cromosoma X, 470
Inductores, 457
Inestabilidad dinámica, 326-327, 327f
Infección lítica, 24, 25f
Infecciones
bacteriana resistente, 102HP
causante de cáncer, 623fn
lítica, 24, 25f
mecanismos protectores, 664
respuestas inmunes adaptativas, 665
respuestas inmunes innatas, 663-665, 665f
viral, 24-25, 25f
Infecciones virales, tipos de, 24-25, 25f
Inflamación
adhesión celular en, 241-243HP, 242HPf
como respuestas innatas a los patógenos invasores, 664
Influenza, 23
Información genética
codificación, 436-439
decodificación de codones, función del tRNA en, 439-442
en células, 5
traducción
elongación y terminación, 445-448
inicio de, 442-445
Ingeniería de nucleasas en edición y silenciamiento de genes, 737-738, 738f
Ingeniería de proteínas, 73-76
diseño de medicamentos basado en estructuras, 75-76
nuevas proteínas, producción de, 74-75
Inhibición no competitiva, 99-100, 100f
Inhibición por retroalimentación, 110, 110f
Inhibidor de GSK-3, 67HP
Inhibidor de la síntesis de pirimidina, 671HP
Inhibidores competitivos, 99, 99f, 100f
Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI, *guanine nucleotide-dissociation inhibitors*), 608
Inhibidores en portadores de transporte de electrones, 182, 182f
Inhibidores irreversibles, 98-99
Inhibidores PARP-1, 658
Inmunidad, 662
Inmunidad humoral, 665
Inmunidad mediada por células, 665, 685
Inmunización pasiva, 65-66HP, 671
Inmunofluorescencia, 696
Inmunofluorescencia directa, 740
Inmunofluorescencia indirecta, 740
Inmunoglobulinas, 678-681, 679f, 679t, 680f, 738-740. *Véase también* Anticuerpos
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, *chromatin inmunoprecipitation*), 494
Inmunoterapia, 654-656
Inmunoterapia activa, 655
Inmunoterapia pasiva, 654-655
Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3, *inositol triphosphate*), 597f, 598, 598t
canales de $Ca^{2+}$ activados por voltaje y, 613-614
Inoué, Shinya, 564-565
Instituto Nacional del Envejecimiento (NIA, *National Institute of Aging*), 112HPf
Insulina
receptores
como proteína-tirosina cinasa, 611
diabetes mellitus, 613
señalización por, 611-613
sustratos, 611-612, 612f
transporte de glucosa, 612-613, 612f
resistencia, 613
secuenciación de, 53
Integrinas, 231-232
adherencia célula-célula mediada por, 239
clasificación de, 232t
conformaciones de, 232f
en la agregación plaquetaria, 233-234, 233f
fuerza necesaria para activar, medición, 235, 236f
Interacción cruzada, en vías de señalización celular, 618, 618f, 619f
Interacción intercelular en membranas plasmáticas, 116
Interacción no covalente, 86, 92, 93f
Interacciones celulares, 237-241
adhesión célula-célula, 237-238
cadherinas, 238f, 239-241, 240f, 241f
reconocimiento célula-célula, 237-238, 237f
selectinas, 238-239, 238f
superfamilia de las inmunoglobulinas, 238f, 239
Interacciones extracelulares, resumen de, 223, 223f
Interacciones hidrofóbicas, 36, 37f
Interacciones proteína-proteína, 59-60, 59f, 60f, 72-73, 73f, 714-715
Interactoma, 72, 73
Interactómica 72-73
Intercambiador de aniones, 712
Intercambiador de cationes, 712
Intercambiadores, 156, 157HP
Intercinesis, de meiosis, 577
Interfase, 540f, 543f, 547, 548f
definida, 541
de meiosis, 572f, 577
de mitosis, 552, 554, 554f, 555f, 556, 562, 563f, 567
Interferencia de RNA (RNAi, *RNA interference*), 265, 265f, 430, 432, 430f, 736-737, 737f
aplicaciones clínicas de, 432-433HP
Interferencia Nomarski, 696
Interferón de citocina α (IFN-α, *cytoquine interferon a*), 691
Interferones (IFN, *interferons*), 676
Interferones tipo 1 (IFN-α e IFN-β), 665
Interleucinas (IL, *interleukins*), 676
Intermediario común, 88
Intermediarios metabólicos (metabolitos), 41, 103
Intrones, 420, 421, 423
descubrimiento de, 421f
eliminación de, a partir de preRNA, 425-429
en el gen de la ovoalbúmina, 422, 423f
en genes de las globinas, 421, 422, 422f
estructura y vía de autoempalme de intrones del grupo II, 426, 426f
Inversiones, 478HP, 478f
Inyección de refuerzo, 671
Iones, 34
diferencias en la concentración de, en célula de mamífero, 152, 152t
difusión de
a través de membranas, 143-147
iones de potasio fuera de una célula, 140
hidrógeno, 39, 39fn, 116f, 154, 186
sistemas de transporte (*Véase* Transporte activo)
Iones de hidrógeno, 39, 39fn, 116f, 154, 186

Iones de potasio ($K^+$)
activado por voltaje, 144-147
estados de conformación de, 147, 147f
hélices de, 145, 146, 146f
mamífero, estructura tridimensional de, 145, 146f
subunidades de, 145, 146f
difusión de, fuera de una célula, 140
flujo de, 146-147
sitios de unión, 145, 146f
Iones de potasio activados por voltaje ($K^+$), 144-147
estados de conformación de, 147, 147f
hélices de, 145, 146, 146f
mamífero, estructura tridimensional de, 145, 146f
subunidades de, 145, 146f
Ionización por electronebulización (ESI, *electrospray ionization*), 717
Ionización, 33-34
de aminoácidos polares, cargados, 50, 52f
$IP_3$ y canales del $Ca^{2+}$ activados por voltaje, 613-614
IPEX, 678
Irritabilidad, 159
Isoformas, 76
Ivanovsky, Dmitri, 23

## J

Jacob, François, 406
Jamieson, James, 260
Janeway, Charles, 664, 665
Jeffreys, Alec, 420
Jenner, Edward, 671
Jerne, Niels, 666
Johnson, Robert, 542
Joliot, Pierre, 209
Joung, William, 105

## K

Kadota, Ken, 297EP
Kamen, Martin, 202-203
Kanaseki, Toku, 297EP
Kanno, Yoshinobu, 251EP, 252EP
Karlin, Arthur, 148EP
Karnovsky, M. J., 252EP
Katz, Bernard, 160
Kendrew, John, 56
Kerr, John, 622
Keynes, Richard, 143
Khorana, H. Gobind, 722-723
Kirchhausen, Tom, 299EP
Kleckner, Nancy, 574
*Knockouts c*ondicionales, 736
Knudson, Alfred, 640
Köhler, Georges, 738
Kok, Bessel, 209
Korn, Edward, 341
Kornberg, Arthur, 518, 523
Kortschak, Hugo, 218
Krebs, Hans, 173
Kuru, 63HP

## L

L1, 393-394
L1 (L1CAM), 238f, 239
Lacks, Henrietta, 627, 628
Lactosa permeasa, 128, 129f
Lamelipodio, 354, 355f, 356-358, 356f, 358f
Lámina β, 54, 54f, 56, 61
Lámina basal. *Véase* Membrana basal
Lámina nuclear, 460-461, 461f
Láminas, 622
Laminina, 229, 231f
Langley, John, 147-148EP
Lanzadera de fosfato de glicerol, 175, 176f
"Lateralidad" de la membrana, 107f, 111f, 123, 218, 218f, 219
LDL-ferritina, 298EP, 298EPf
Leder, Philip, 421
Lee, Chen-Yuan, 148EP
Lente del condensador, 693, 693f
Lente objetivo, 693, 693f
Lente ocular, 693f, 694
Leptoteno, 574, 574f
Leucemia linfoblástica aguda (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*), 644, 651, 653
Leucemia linfocítica crónica (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*), 655-656
Leucemia mielógena crónica (CML, *chronic myelogenous leukemia*), 75, 75f, 76, 649, 656, 659
Leucemia mieloide aguda (AML, *acute myeloid leukemia*), 647, 648, 651, 652f, 653f
Leucemias
análisis de expresión génica, 651-652, 653f
células madre del cáncer, 659
genes supresores de tumores y, 642
genética y, 636
genoma del cáncer y, 649
inmunoterapia para, 655
linfoblástica aguda, 644, 651, 653
linfocítica crónica, 655-656
medicamentos inhibidores de proteínas, 656
microRNA y, 649
mielógena crónica, 656
mieloide aguda, 647-648, 651, 652f, 653f
mutaciones genéticas en, 644
nuevos casos y muertes en Estados Unidos en 2015, 629f
oncogén y, 632-636EP, 647-648
Leuco metiltioninio, 67HP
Levadura cdc2, en estudio MPF, 546EP
Levadura, replicación en, 526-527, 528f
Levene, Phoebus Aaron, 378EP
Levinthal, Cyrus, 5
Ley de todo o nada, 161
L-gliceraldehído, 42, 43f
LH (*luteinizing hormone*), hormona luteinizante, 591EP, 594HPf, 595HP, 601t
LHCI, 210
Liberación de calcio inducida por calcio (CICR, *calcium-induced calcium release*), 614, 615f
Ligando CD40 (CD40L, *ligand CD40*), 689
Ligandos, 116, 584
Ligandos peptídicos alterados (APL, *altered peptide ligands*), 670HP
Lignina, 255
Límite de resolución, 694
Línea celular, 710
Lineweaver, Hans, 98
Linezolid, 102HP
Linfocitos B. *Véase* Células B
Linfocitos T. *Véase* Células T
Linfocitos, 665. *Véanse también* Células B; Células T
activación, 689-691, 690f
activación por señales de superficie celular, 689
Linfoma, 629f, 631, 640t, 647, 648, 649, 655
Linfoma de Burkitt, 631, 647
Linfoma de células B no Hodgkin, 655
Linfomas foliculares de células B, 648
Lípidos, 46-48
esteroides, 47, 47f
fosfolípidos, 47-48, 48f
grasas, 46-47, 46f, 47f
membrana (*Véase* Lípidos de membrana)
Lípidos de membrana, 118-122
asimetría de, 121-122
bicapa de (*Véase* Bicapa lipídica)
composición de, 118-122, 121t
colesterol, 120, 120f
esfingolípidos, 119-120, 119f
fosfoglicéridos, 119, 119f
fosfolípidos, 119-120, 119f
glucolípidos, 118f, 119-120, 119f, 120f, 122
liposomas, 120-121, 121f
relación de lípido a proteína, 118
vaina de mielina, 118, 118f
fluidez (*Véase* Fluidez de la membrana)
movilidad de (*Véase* Movilidad, proteínas y lípidos)
Lipofección, 733
Lipopéptidos cíclicos, 102HP
Lipopolisacárido (LPS, *lipopolysahcaride*), 664
Lipoproteína de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*), 298-299EP, 298EPf, 302, 302f
Lipoproteínas de alta densidad (HDL, *high-density lipoproteins*), 302-303
Liposomas, 120-121, 121f
Lisina, reacciones de ionización de, 50, 52f
Lisis, 24
Lisosomas, 9f, 11f, 291-292, 291f
*Listeria monocytogenes*, 304, 358EP
Localización de linfocitos, 238
Localización subcelular, 548-550, 549f
Loewenstein, Werner, 251EP, 252EP
Loewi, Otto, 148EP
Loisel, Thomas, 359EP
London, E. S., 378EP

Longevidad, restricción calórica y, 111-112HP
Luft, Rolf, 195HP
Lupus eritematoso sistémico (SLE, *systemic lupus erythematosus*), 669 HP, 669HPf

## M

M. *capricolum*, 22
*M. mycoides*, 22
MacKinnon, Roderick, 144
MacLeod, Colin, 379EP
Macrófagos, 672-673EP, 676, 676f, 677, 677fn, 680, 686, 689
Macromoléculas, 40, 41f
Macronúcleos, 15f
Maduración de ovocito, MPF en, 543-544EP, 544EPf, 576
Magnificación vacía, 694
Mal plegamiento de proteínas, 62-67HP, 63HPf
  enfermedad de Alzheimer, 64-67HP, 64HPf
  enfermedad de Creutzfeld-Jakob, 62-64HP
Malaria, 137, 631, 662, 685
Manton, Irene, 329
MAP cinasa (MAPK, *MAP kinase*)
  adaptación, transmitir información, 610, 610f
  pasos generalizados, 609f
  vía, 589, 590f, 610, 610f
MAP cinasa cinasa (MAPKK, *MAP kinase kinase*), 609f, 610, 610f
MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, *MAP kinase kinase kinase*) 609f, 610, 610f
Mapa de densidad electrónica, 150EP, 150EPf
Mapeo por deleciones, 493
Máquina Rube Goldberg, 7f
Maquinaria que opera en la horquilla de replicación 521-522, 521f, 522f
Margulis, Lynn, 26EP, 27EP
Marihuana, 165, 211
Markert, Clement, 543-544EP
Marsland, Douglas, 568
Masa celular interna, 735
Masui, Yoshio, 543-544EP
Material pericentriolar (PCM, *pericentriolar material*), 321-323, 321f, 558
Matrices de microtúbulos, 324, 324f
Matriz extracelular (ECM, e*xtracellular matrix*), 224, 225f, 226f
  componentes de, 226-231
    colágeno, 226-228, 227f, 228f
    fibronectina, 229, 230f, 231f
    laminina, 229, 231f
    proteoglucano, 228-229, 228f
  de las células del cartílago, 224, 225f
  definido, 224
  glucocálix en, 224, 224f
  integrinas (*Véase* Integrinas)
  membrana basal en, 224, 225f
  organización macromolecular de, 224, 226f
  propiedades dinámicas de, 231
Matriz mitocondrial, 170, 171, 172, 173f
Matthaei, Heinrich, 437
MC1R, 537HP
McCarty, Maclyn, 379EP
McClintock, Barbara, 391
McCord, Joe, 34HP
McCulloch, Ernest, 18HP
McDevitt, Hugh, 672EP
Mecánica cuántica, 203fn
Mecanismo de cambio de enlace en la formación de ATP, 189-192
  componentes de, 189-190
  evidencia en apoyo, catálisis rotatoria y, 190-192, 191f, 192f
Mecanismo sintetizador de ATP, 4f, 5
Mecanosensor, 235
Mecanotransducción, 235
Medicamento dirigido a proteínas, desarrollo de, 75, 75f
Medicamentos
  citoesqueleto y, 309, 310
  desarrollo de, 75, 111, 432HP
Medicamentos antiácidos, 154
Medicamentos estatinas, 302
Medicamentos inhibidores de proteína para el cáncer, 656-658, 657t
Medicamentos inmunosupresores, 670HP
Médula ósea, 18HP, 197HP, 231f, 235, 242HP, 288HP, 402HP, 475, 476, 481, 662, 662f, 665, 666f, 669HP, 686
Medzhitov, Ruslan, 664
Meiosis, 571-580
  células haploides como producto de, 572f, 577, 578f
  cigótica o inicial, 572, 573f
  errores meióticos y consecuencias de, 577-579HP
  espórica o intermedia, 572-573, 573f
  etapas de, 572f
    anafase, 572f, 576f, 577
    intercinesis, 577
    interfase, 572f, 577
    metafase, 572f, 576-577, 576f
    profase, 572f, 574-577, 574f
    telofase, 572f, 577
  gamética o terminal, 572, 573f, 574f
  recombinación genética durante, 572, 574, 575, 579HP, 575f, 579-580, 579f
  resumen de, 571-572
Meiosis gamética, 572, 573f, 574f
Meiosis terminal, 572, 573f, 574f
Melanocitos, 537HP
Melanoma
  genes *BRAF* en, 647, 649
  genes supresores de tumores, 640t
  inmunoterapia para, 655
  medicamentos inhibidores de proteínas para, 657, 657f, 658
  mutaciones genéticas en, 642f
  nuevos casos y muertes en Estados Unidos en, 2015, 629f
  radiación ultravioleta y, 535, 536-537HP, 631
Mello, Craig, 430
Membrana basal, 136, 136f, 224, 225f
  armazón, 231f
  células metastásicas, 242-243HP
  colágeno, 227-228, 228f
  definido, 224
  fibronectina, 230f
  hemidesmosoma, 236, 236f, 237
  laminina de, 229, 231f
  proteoglucano, 228-229, 228f
Membrana mitocondrial externa (OMM, *outer mitochondrial membrane*), 170, 304, 305f, 623
Membrana mitocondrial interna (IMM, *inner mitocondrial membrane*), 170, 304, 305f
Membrana plasmática de eritrocitos, 137-139, 138f
  carbohidratos de glucolípidos de, 122, 123f
  distribución asimétrica de fosfolípidos en, 122f
  esqueleto, 137, 138f, 139
  proteínas de, 137, 138f
Membranas celulares. *Véase también* Membranas plasmáticas
  bioenergéticas en, 82
  canales iónicos en, 143-147, 143f
  colesterol en, 47, 47f
  fosfolípidos de, 48, 596, 596f
  lactosa permeasa en, 128, 129f
  movimiento del soluto a través de, 139-140, 139f
  preparación en células rotas, 595-596
  transporte de sustancias a través de, 32
Membranas plasmáticas, 7, 8f, 9, 9f, 10t, 11f, 23, 26EP, 114, 167
  aspecto trilaminar de, 115f
  carbohidratos, 122-123, 122f, 123f
  difusión a través de la bicapa lipídica, 140-143
  difusión de iones a través, 143-147
  estructura y propiedades de, estudiando, 126-130
    cambios de conformación en la proteína de membrana integral, 128-130, 129f, 130f
    dominios transmembrana, 127-128, 127f, 128f
    solubilización de proteínas de membrana con detergentes, 126, 126f
  fluidez (*Véase* Fluidez de la membrana)
  funciones de, 115-116
    armazón para actividades bioquímicas, 115
    compartimentación, 115
    interacción intercelular, 116
    proporcionando una barrera selectivamente permeable, 115
    respondiendo a estímulos externos, 116
    resumen de, 116f
    transducción de energía, 116
    transporte de soluto, 116

glóbulos rojos (*Véase* Membrana plasmática de eritrocitos)
historia de estudios sobre, 116-117
introducción a, 115
lípidos (*Véase* Lípidos de membrana)
movimiento del soluto a través de las membranas celulares, 139-140
energética de, 139-140 (*Véase también* Difusión)
gradiente electroquímico, 140
naturaleza dinámica de, 132-135
difusión de proteínas de membrana después de la fusión celular, 133, 133f
movilidad (*Véase* Movilidad, proteínas y lípidos)
movimiento de fosfolípidos, 132, 133f
neurotransmisión, 162-165 (*Véase también* Sinapsis)
potenciales (*Véase* Potenciales de membrana)
proteínas (*Véase* Proteínas de membrana)
transporte activo (*Véase Transporte activo*)
Memoria inmunológica, 667-668
Mendel, Gregor, 367-368, 369-370, 387HP
rasgos de la planta del guisante, 368t
Meningitis, 304
Mensajeros extracelulares, 583-584, 583f, 584f, 586
formación de cAMP en respuesta a la adición de, 595-598, 595f. (*Véase también* Segundos mensajeros)
insulina como, 611
receptores, 586
aminoácidos y derivados de aminoácidos, 586
eicosanoides, 586
esteroides, 586
gases, 586
polipéptidos y proteínas, 586
Mensajeros intracelulares
calcio como, 613-617
óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) como, 619-621, 620f
Menten, Maud, 97
Meselson, Matthew, 406, 513-515, 515f
Meselson, Stahl y la replicación del DNA (Holmes), 514fn
Metabolismo, 103-105. *Véase también* Regulación metabólica
captura y utilización de energía, 103-105
definido, 103
enzimas de, 6, 29EP
errores innatos de, 405
etapas de, 103, 104f
fotosintético, 20
reacciones de oxidación-reducción (redox), 103
Metabolismo aeróbico, 172-177, 177-178HP
ciclo TCA, 173, 175, 175f, 176f
ejercicio en, función de, 177-178HP
glucólisis, 172-173, 174f
lanzadera de fosfato de glicerol, 175, 176f
Metabolismo en estado de equilibrio, 9f, 88-89
Metabolismo fotosintético, 202-203
Metafase
de meiosis, 572f, 576-577, 576f
de mitosis, 553f, 560-562, 561f
Metagenoma, 14
Metaloproteinasas de matriz (MMP, *matrix metalloproteinases*), 231, 243HP
Metástasis, 628, 628f, 637, 645
adhesión celular en, 241-243HP, 243HPf
definido, 242HP
miRNA en, 649
oncogén en, 638, 639
propagación de, pasos en, 243HPf
propiedades de superficie celular de, 242HP
uniones gap en, 251-253EP
Meticilina, 102HP
Metilación del DNA, 500-501, 501f, 647
MHC clase I, 673-674EP, 674EPf, 675EPf, 685-686, 687f, 688f
MHC clase II, 669HP, 673EP, 685, 686, 687f, 688f, 689, 690f
MHC restringido, 672EP
Micelas, 46, 47f
Michaelis, Leonor, 97
Micoplasma, 14
Microbioma, 14-15
Microfibrillas de celulosa, 313, 314f
Microfibrillas, 254, 254f
Microfilamentos. *Véase* Filamentos de actina
Microglobulina B2, 685
Micrografías electrónicas
de células apoptóticas, 621f
de células eucariotas, 10, 11f
de centrosoma, 323f
de crestas, 170, 171f
de DNA de doble hélice, 521, 521f
de DNA superenrollado, 382f
de glucógeno, 44f, 45
de GroEL, 68EP, 69EPf
de hnRNA y mRNA, 421f
de hoyos cubiertos, 294, 294f
de la citocinesis, 571, 572f
de la síntesis de ATP, 188, 188f, 192
de lisosomas, 291, 291f
de MAP, 313, 313f
de membrana plasmática, 115, 115f
de membranas de órganos eléctricos, 149-150EP, 150EPf
de movimiento de materiales a través del poro nuclear, 462, 462f
de muestras teñidas negativamente, 705, 705f
de nAChR, 149-150EP, 150EPf
de polirribosomas, 449f
de propagación celular, 234f
de ribosoma, 79f
de sarcómero, 347f
de snoRNA, 415, 415f
de transporte a través del complejo de Golgi, 279-280, 280f
de uniones gap, 248, 248f, 252EP
de vesículas recubiertas, 281f
del canal iónico TRPV, 126f
del complejo de poro nuclear, 462, 463f
del complejo sinaptonémico, 574-575, 575f
del intrón en el gen de la globina, 422f
microscopios electrónicos utilizados en, 701, 708, 708f
Micrómetro (µm), 21
MicroRNA (miRNA, *microRNA*), 407, 431f, 434-435, 434f
en control traslacional, 508-509, 508f, 509f
en el cáncer, 649
en genética del cáncer, 649
Microscopia, 2
contraste de fases, 695-696, 696f
escaneo electrónico, 707-708, 707f
fluorescencia, 696-701
fuerza atómica, 708-709, 708f
luz de campo brillante, 695
preparación de muestras para, 703-707, 704f
criofijación y uso de muestras congeladas, 703, 704-705
difusión de sombras, 705, 705f
grabado por congelación, 706, 707, 707f
replicación de fractura por congelación, 705, 706, 706f
tinción negativa, 705, 705f
transmisión electrónica, 701-703, 702f
Microscopia confocal láser de barrido, 699,700f
Microscopia de campo brillante, 695, 696f
Microscopia de fluorescencia, 696-701
fluorescencia de doble etiqueta, 697, 698f
Microscopia confocal láser de barrido, 699, 700f
Microscopia de fluorescencia de láminas de luz, 700-701, 701f
Microscopia de fluorescencia de superresolución, 699-700, 701f
proteína fluorescente verde, 697f
recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo, 698, 698f, 699f
transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, 697-698, 698f
Microscopia de fluorescencia de láminas de luz, 700-701, 701f
Microscopia de fluorescencia de superresolución, 699-700, 701f
Microscopia de fuerza atómica (AFM, *atomic force microscopy*), 708-709, 708f
Microscopia electrónica de barrido (SEM, *scanning electron microscopy*), 701, 707-708, 707f
Microscopia electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*), 701-703, 702f, 707-708
Microscopio de fluorescencia de reflexión interna (TIRF, *internal reflection fluorescence*), 299EP

Microscopio de interferencia, 696
Microscopio óptico, 693-695
diagrama seccional a través, 693, 693f
poder resolutivo de los ojos, 694, 694f
resolución, 694, 694f
tinción de Feulgen, 695, 695f
vías tomadas por los rayos de luz, 693, 693f
visibilidad, 695
Microscopios, 2, 2f. *Véase también* Microscopio óptico
Microtúbulos, 311-312
centros organizadores de microtúbulos, 321-323
centrosomas, 321-322, 321f, 322f
cuerpos basales, 322, 329, 331f
nucleación de microtúbulos, 322-323, 323f
citoesqueleto, 311-312, 321-323
como agentes de motilidad intracelular, 314-315
como soportes estructurales y organizadores, 313-314, 313f
corticales de planta, nucleación de, 324, 324f
de fragmoplasto, 571
de metafase, 560-561, 562
astral, 561
cromosómico (cinetocoro), 560-561
polar (interpolar), 562
dinámica de, 323-327
+TIP, enlace de, 326-327, 327f
base de, 325-327
en células vivas, 326, 326f
inestabilidad dinámica, 326-327, 326f, 327f
propiedades de, 323-324, 324f
en tubo de ensayo, 325f
estructura y composición de, 312, 312f
GTP para el montaje de, 325-326, 326f
localización de, 313f
MAPA, 310, 313, 313f
matrices de, 324, 324f
microfibrillas de celulosa, 313, 314f
nucleación, 322-323, 323f
de microtúbulos corticales de plantas, 324, 324f
propiedades de, 310t
proteínas asociadas con, 310, 313, 313f
resumen de, 310, 311f
transporte axonal, 314-315, 314f, 315f
Microtúbulos astrales, 561
Microtúbulos cinetocóricos (cromosómicos), 560-561
Microtúbulos corticales de plantas, nucleación de, 324,324f
Microtúbulos cromosómicos (cinetocoro), 560-561
Microtúbulos interpolares (polares), 562
Microtúbulos polares (interpolares), 562
Microvellosidades, 3, 4f, 9f, 21
Mieloma múltiple, 679, 680f, 681, 738-739, 739f
Miescher, Friedrich, 377-378EP
Migración de rama, 580
Miller, Stanley, 31-32
Milstein, Cesar, 738
Minsky, Marvin, 699
Miofibrillas, 346, 346f
Mioglobina, 55f, 56, 57f
estructura tridimensional de, 56, 57f
función de, 56
patrón de difracción de rayos X de, 55f, 56
Miosina convencional (tipo II), 341, 341f, 342f
Miosina, 341-344
cambios de conformación en, 58
en citocinesis, 568, 569, 569f
en movimiento basado en lamelipodio de los queratocitos de peces, 357, 357f, 358
miosina convencional (tipo II), 341, 341f, 342f
miosina no convencional, 341, 343-344, 343f, 344f, 345f
mutaciones, sordera y, 344
resumen de, 341
Miosina no convencional, 341, 343-344, 343f, 344f, 345f
MiRNA. *Véase* MicroRNA (miRNA)
Mitchell, Peter, 176, 177f
Mitchison, Tim, 358-359EP
Mitocondria, 8f, 9f
ATP sintasa
anillo *c* oligomérico de, 188, 189, 189f
estructura de, 187-189, 189f
maquinaria para, 188, 188f
porción de $F_0$, 188, 189f, 192-193, 193f
captación postraduccional de proteínas en, 304-306, 304fn, 305f
células eucariotas que carecen, 27EPn
chaperonas moleculares en, 68EP
composición de, 3-5, 4f
desaparición durante la evolución, 27EPn
en células diferenciadas, 15, 16
en células eucariotas, 10, 11f, 26EP, 26EPf, 27EP
enfermedades resultantes de una función anormal de, 195-196HP, 196HPf
estructura y función de, 169-172, 169f, 171f
fusión y fisión, 169, 170f
matriz mitocondrial, 170, 171, 172, 173f
membranas mitocondriales, 170-172
porinas, 172, 172f
forma de, 15, 16
formación de ATP
coenzimas reducidas en, 175-177, 176f, 177f
experimento para conducir, 188, 188f
fosforilación oxidativa en, 178-182
mecanismo de cambio de unión, 189-192
fuerza motriz de protones
establecimiento de, 186-187, 187f
otras funciones de, 193, 194f
gradiente de protones, 192-193
porción de $F_0$ de ATP sintasa en la síntesis de ATP, función de, 192-193, 193f
usando, 192-193
membranas, 170-172
metabolismo aeróbico, 172-177, 177-178HP
ciclo TCA, 173, 175, 175f, 176f
ejercicio en, función de, 177-178HP
glucólisis, 172-173, 174f
sistema de transporte de fosfato de glicerol, 175, 176f
peroxisomas en comparación con, 194
tamaño de, 21, 22f
transporte de electrones, 180-186
MitOS, 170
Mitosis, 541, 552-571. *Véase también* Citocinesis
definido, 552
entrada de una célula en, MPF y, 542
etapas de, 552, 553f
anafase, 553f, 562-567, 563f
interfase, 552, 554, 554f, 555f, 556, 562, 563f, 567
metafase, 553f, 560-562, 561f
prometafase, 553f, 559-560, 559f
profase, 552, 553f, 554-558, 554
telofase, 553f, 567-571, 567f
resumen de, 552
Modelado por homología, 126
Modelo de filamento deslizante de la contracción muscular, 346, 347f, 348-351
acoplamiento de excitación-contracción, 350-351, 350f, 351f
base molecular de la contracción, 348-350, 349f
composición y organización de filamentos gruesos y finos, 348, 348f
Modelo de maduración cisternal, 278-279, 280f
Modelo de transporte vesicular, 278-279, 280f
Modelo Michaelis-Menten, 97-98
Modelos animales, 65HP, 67HP, 733-734
Modificación covalente, 109-110
Modificaciones de la histona, 647
Modificaciones postraduccionales (PTM, *posttranslational modifications*), 50, 52
Modulación alostérica, 110
Moerner, W. E., 699-700
Molécula anfótera, 38
Moléculas
adhesión celular, 238f, 239
anfipática, 46
biológica (*Véase* Moléculas biológicas)
CD4, 23, 677, 685, 685f, 688, 689
CD8, 677, 685, 685f, 688
de la función miscelánea, 41
inorgánica, 39
no polar, 33
orgánica, 39
polar, 33
superfamilias de, 76
Moléculas anfipáticas, 46

Moléculas biológicas
clasificación de, por función, 40-41
intermediarios metabólicos (metabolitos), 41
macromoléculas, 40, 41f
moléculas de función miscelánea, 41
grupos funcionales, 40, 40t
naturaleza de, 39-41
Moléculas CD4, 23, 677, 685, 685f, 688, 689
Moléculas CD8, 677, 685, 685f, 688
Moléculas inorgánicas, 39
Moléculas no polares, 33
Moléculas orgánicas, 39
Moléculas polares, 33
Moncada, Salvador, 620
Monod, Jacques, 406
Monofosfato de adenosina (AMP, *adenosine monophosphate),* 87f, 111
Monofosfato de adenosina cíclico. *Véase* cAMP
Monofosfato de desoxiadenosina (dAMP, *deoxyadenosine monophosphate*), 373fn, 374f
Monofosfato de guanosina cíclico. *Véase* cGMP
Monómeros, 40, 41f
Monosacáridos, 42, 42f
*Monosiga brevicollis*, 223
Montaje completo, 695
Moore, Peter, 453EPf
Morfogénesis, 239-240, 240f
Morgan, Thomas Hunt, 370
Motilidad celular, 353-358
actina y miosina en movimiento basado en lamelipodio de los queratocitos de peces, 357, 357f, 358
borde delantero de la célula movible, 354, 355f
extensión lamelipodial, 356, 356f
fuerzas de tracción en la migración de fibroblastos, distribución de, 357, 357f
micrografía electrónica de fibroblastos de ratón, 354, 354f
motilidad basada en la actina sin células, 358-360EP, 359EPf, 360EPf
motilidad celular dirigida, 354, 355f
secuencia de actividades que ocurren cuando la célula se arrastra sobre el sustrato, 354, 354f
Motilidad celular dirigida, 354, 355f
Motilidad intracelular, microtúbulos como agentes de, 314-315
Motivo de cremallera de leucina, 491
Motivo de dedo de zinc, 490, 490f
Motivo hélice-espiral-hélice, 490-491, 491f
Motivo SNARE, 288
Movilidad, proteínas y lípidos, 133-136, 134f
control de la movilidad de la proteína de la membrana, 134-135, 135f
dominios de membrana y polaridad celular, 136, 136f
FRAP para medir la tasa de difusión, 133-134, 134f
movilidad de los lípidos de la membrana, 135-136, 135f
Movimiento basado en lamelipodio de los queratocitos de peces, actina y miosina en, 357, 357f, 358
Movimiento browniano, 134, 135f, 306
Movimiento del soluto, 139-140, 139f
energética de, 139-140 (*Véase también* Difusión)
gradiente electroquímico, 140
MPTP, 195-196HP
mRNA ovomucoide, 428, 429f
MRNA. *Véase* RNA mensajero (mRNA)
MS tándem, 717
MS/MS, 717
Muerte por negligencia, 688, 688f
Muestras congeladas, criofijación y uso de, 703, 704-705
Muller, H. J., 371
Mullis, Kary, 726
Murad, Ferid, 620
Murray, E. G. D., 358EP
*Mus musculus*, 16, 17f
Músculo del corazón, 76, 178HP, 249, 620
Mutación de ganancia de función, 388HP
Mutación J. D., 299EP
Mutación somática, 594HP
Mutaciones sin sentido, 448
Mutaciones virales, 24
Mutaciones, 370
alterar la estructura de las proteínas de señalización, 594HP
en células iPS, 20HP
en DNA, 27EP
en trastornos hereditarios, 62, 64HP, 66HP, 67HP
estructura molecular de los genes y, 5
ganancia de función, 388HP
genética
cáncer de colon en, 642f, 645, 650, 650f, 658
en cáncer de mama, 640, 642f, 644
en cáncer de próstata, 640, 642f, 644
en leucemias, 644
en melanoma, 642f
J. D., 299EP
miosina, sordera y, 344
sin sentido, 448
somática, 594HP
tasa espontánea de, 524
viral, 24
Mutagénesis de sitio dirigido (SDM, *site-directed mutagenesis*), 74-75, 735
Mutagénesis *in vitro*, 735
Mutagénesis, 371-373, 372f
dirigida a sitio, 74-75, 735
*in vitro*, 735
Mutante, 370
Mutantes sensibles a la temperatura (*ts, temperature-sensitive*), 516
MVA,566
*Mycobacterium tuberculosis*, 303

## N

*N*-acetilgalactosamina, 122-123, 122f
*N*-acetilglucosamina, 274
Nachmansohn, David, 148EP
NAD/NAD$^+$, 105, 106f, 107f, 108, 108f, 109
en fermentación, 108, 108f
en glucólisis, 105, 106f, 107f
estructura de, 107f
forma oxidada de NADPH, NADP$^+$ formado desde, 109
reducción de, a NADH, 107f
NADP$^+$, 107f, 109
NADPH
en la fotosíntesis, 203, 203f, 210-211, 210f, 212f, 214f, 215f, 218, 219
en transferencia de electrones, 103, 107f, 109
Nanómetro (nm), 21
Naturaleza reduccionista de la biología célular y molecular, 2
Naus, Christian, 253EP
NCAM (*neural cell-adhesion molecule*), molécula de adhesión celular neural, 239
Necroptosis, 621, 624
Necrosis, 621
Neher, Erwin, 143
*Neisseria meningitidis*, 102HP
NEM, 128-129, 129f
Neumococo, 378-379EP
Neupert, Walter, 68EP
Neurofilamentos, 335t, 338
Neuronas postsinápticas, 148EPn, 164, 165
Neuronas presinápticas, 163, 163f, 164, 165
Neuronas. *Véase* Células nerviosas (neuronas)
Neurotransmisión, 162-165, 164f. *Véase también* Sinapsis
Neurotransmisores, 163-165, 163f, 164f
acetilcolina, 147-151EP, 163, 164f
GABA, 164
glutamato, 164, 165
GPCR, 164fn
norepinefrina, 163
recaptura de, 165
Niedergerke, Rolf, 348
Nirenberg, Marshall, 437
Nitroglicerina, 620
Nitróxidos, 129, 130f
No disyunción meiótica, 577-579HP, 578HPf
No disyunción primaria, 578-578HP, 578HPf
No disyunción secundaria, 578-578HP, 578HPf
No disyunción, meiótica, 577-579HP, 578HPf
No equilibrio, 88-89
No plantilla para DNA polimerasa, 518f
Nobel, Alfred, 620
Nodo sinoatrial, 249
Nódulos de las leguminosas, 734
Nódulos de Ranvier, 159f, 162
Nódulos de recombinación, 575, 575f

Noller, Harry, 452EPf
Nucleación de microtúbulos corticales de plantas, 324, 324f
Nucleación de microtúbulos, 322-323, 323f
Nucleasas con dedos de zinc (ZFN, *zinc-finger nucleases*), 737
Núcleo, 8f, 9f, 10, 11f
  como organelo organizado, 480-483, 481f, 482f, 483f
Nucleoide, 8f, 10
Nucléolo/nucléolos, 413, 413f
Nucleosoma, 465-467, 466f
Nucleótido, 77, 373fn. *Véase también* Desoxirribonucleótidos trifosfato
Nucleótidos, 77-78, 77f, 373, 373fn, 374, 374f
Nucleótidos difosfatos, 373fn
Nucleótidos monofosfatos, 373fn
Nucleótidos trifosfatos, 373fn, 591-592EP, 597
Número de gen, 389, 390f, 394
Número de giro, 98
Nurse, Paul, 546EP, 547

## O

Oakley, Berl, 322
Ocludina, 247
O'Farrell, Patrick, 716
Ohno, Susumu, 389-390
Oligodendrocitos, 19HP
Oligosacáridos *N* ligados, 273-274, 273f, 278,279f
Oligosacáridos, 44, 122, 122f, 273-274, 273f
Oligosacariltransferasa, 270
Olor (olfato), 603
Omnitarg, 655
Oncogén *MYC*, 647
Oncogén *SRC*, 633-634EP, 647
Oncogenes, 607, 609, 646-648
  activación de protooncogenes a, 638, 639, 639f
  codificación de enzimas metabólicas, 647-648
  codificación de factores de crecimiento, 646-647
  codificación de factores de transcripción, 647
  codificación de productos que afecta la apoptosis, 648, 48f
  codificación de proteínas que afecta el estado epigenético de la cromatina, 647
  codificación de proteínas cinasas citoplasmáticas, 647
  descubrimiento de, 633-636EP
  resumen de, 638-639, 638f
Operador, 457
Operón bacteriano, 456-459, 457f
  atenuación, 459
  operón lac, 457, 459, 459f
  operón triptófano (trp, *tryptophan*), 457
  organización de, 457f
  regulación génica por, 457, 458f
  represión catabólica, 459, 459f
Operón inducible, 457
Operón lac, 457, 459, 459f
Operón triptófano (trp, *tryptophan*), 457
Opistocontos, 28EP
Orai1, 615, 616f
Organelos
  apariencia de, bajo el microscopio, 3
  de células eucariotas, 8, 8-9f, 10, 11f, 26EP, 27EP
  de células procariotas, 8, 8-9f
  definido en micrómetros, 21
  en biología sintética, 22
  en células diferenciadas, 15-16
  núcleo como organizado, 480-483, 481f, 482f, 483f
  rotación, 291-292
  sistema de endomembrana, 258-260, 259f
Organismos modelo, 16, 17f
Organismos multicelulares, evolución de, 222, 223
Organización macromolecular de ECM, 224, 226f
Organización muscular y contracción, 344-351
  estructura de, 346, 346f
  modelo de filamento deslizante de la contracción muscular, 346, 347f, 348-351
  sarcómeros, 346, 347f
Órganos linfoides, 662, 662f, 665, 738
Orientación del sustrato, 94, 94f
Origen de la replicación (oriC), 517, 521
Ósmosis, 141-142, 141f, 142f, 157HP
Osteogénesis imperfecta, 227
Overton, Ernst, 116
Ovillos neurofibrilares (NFT, *neurofibrillary tangles*), 64HPf, 67HP
Ovocitos secundarios, 577
Ovogonia, 572, 573f
Oxidación anaeróbica del piruvato, 108
Óxido nítrico (NO, *nitric-oxide*)
  como activador de la guanilil ciclasa, 620
  como mensajero intercelular, 619-621, 620f
  inhibiendo la fosfodiesterasa, 620-621

## P

P680, 207, 208f
P700, 207, 210-211, 210f
Pääbo, Svante, 398
Pace, Norman, 451EP
Painter, Theophvilus, 372, 373
Palade, George, 260, 263
Palmiter, Richard, 733
Pantallas de interferencia de RNA en todo el genoma (RNAi, *RNA interference*), 72
Paquiteno, 574f, 575, 575f
Par de bases no coincidentes, 524-526, 525f
Paradoja de Levinthal, 5
Pardue, Mary Lou, 386
Pared celular, 2, 8f, 9, 14, 254-255, 254f, 255f
  matriz de, 254-255, 255f
  hemicelulosas, 254-255
  pectinas, 255
  proteínas, 255
  placa de célula de, 255
  primaria, 255
  secundaria, 255
Paredes principales, 255
Paredes secundarias, 255
Pares de bases, adecuados y no coincidentes, 524-526, 525f
PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*), poli-ADP-ribosa-polimerasa, 658
Partícula beta, 709
Partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*), 268-269, 269f
Partícula nuclear del nucleosoma, 465
Partículas asociadas a la membrana, 124-125, 125f
Pasteur, Louis, 23, 90
Pauling, Linus, 54
PCNA, 529-530, 529f, 529t
PD-1, 655
Pearse, Barbara, 297EP
Pectinas, 255
Pelc, Stephen, 542f
Penfigoide bulloso, 237
Penicilina, 99, 100HP, 101HPt, 102HP
Pentosas, 42
Peptidil transferasa, 445
Péptido de tránsito, 306
Péptido Aβ, 64-67HP, 65HPf
Percepción de cuórum, 582, 583
Percepción sensorial, los GPCR en, 603
Perforinas, 677
Periodo refractario, 160-161, 162f
Peroxisomas, 217
  captación postraduccional de proteínas en, 304
  enfermedades resultantes de una función anormal de, 196, 197HP
  estructura y función de, 193-194, 194f
  glioxisoma, 195, 195f
  mitocondria comparada con, 194
Perutz, Max, 59
PH, 39
PI 3-cinasa (PI3K, *PI 3-kinase*), 612-613
Pigmentos, 204
Pinocitosis, 293
Pinza β, 523, 524f, 529t
Pinzas ópticas, 135
Pirimidinas, 78, 78f, 373
Piruvato, oxidación anaeróbica de, 108
Placa celular, 255, 570-571, 571f
Placa metafásica, 543EP, 560-561,560f, 561f, 562, 564, 566, 567,577
Placas amiloides, 64-67HP, 64HPf
Plantas
  CAM, síntesis de carbohidratos en, 219
  Células
    $Ca^{2+}$ se concentra en, regulando, 617, 617f

citocinesis en, 570-571, 571f
vacuolas, 292-293, 293f
síntesis de carbohidratos
en plantas $C_3$, 213-217, 214f
en plantas $C_4$, 218-219, 218f
en plantas CAM, 219
síntesis de carbohidratos en, 213-219
vías de señalización en, 613
Plantas $C_3$, 213-217, 214f
Plantas $C_4$, 218-219, 218f
Plantas CAM, 219
Plantas transgénicas, 734, 734f
Plantillas para DNA polimerasa, 518, 518f
Plásmido Ti, 734, 734f
Plásmidos bacterianos, clonación de DNA eucariotas en, 725-726, 725f
Plasmodesmata, 247, 250-251, 250f
Plasmólisis, 142, 142f
Plasticidad sináptica, 165
Plastocianina, 210, 210f
Plastoquinona, 207, 208, 209f
Plegamiento de proteínas, 60-62, 61f
chaperonas moleculares en, 62, 62f, 67-70EP
dinámico, 60-62
mal plegamiento, 62-67HP
vía de plegamiento, 61, 61f
vías alternativas, 61, 61f
Plegamiento dinámico de proteínas, 60-62
PLK1, 433HP, 433HPf
PML, 671HP
Polaridad celular, 136, 136f
Polaridad de la actina, determinante, 338, 339f
Poli (A) polimerasa, 424
Poli (U), 437
Poliadenilación, 419f, 425f, 428f
Policistina 1 y 2 (PC1 y PC2), 334HP
Polimerasa PrimPol, 535
Polimerasa, RNA, 520, 523-524, 532, 533f
Polimerasas pausadas, activación transcripcional de, 499
Polimerasas, DNA. *Véase* DNA polimerasas
Polimerización, 40, 40f, 41f
filamentos de actina, 339, 340f, 354, 355f, 356, 358EP, 359EP, 359EPf
Polímeros, 40, 41f
Polimorfismos de nucleótido único (SNP, *single nucleotide polymorphisms*), 398-399, 401-402HP
Polimorfismos genéticos, 398, 400HP, 595HP
Polipéptido P53, 642-644, 643f
en detención del ciclo celular, 642f, 643
en la supervivencia de las células tratadas con agentes quimioterapéuticos, 644, 644f
función de, 642-645
modelo para la función de, 643f
secuencia promovida por, 644-645
Polipéptidos como transportadores extracelulares, 586
Poliposis adenomatosa coli (APC, *adenomatous polyposis coli*), 645
Poliposis adenomatosa familiar del colon (FAP, *familial adenomatous polyposis coli*) 645
Polirribosomas, 449-450, 449f
Polisacáridos estructurales (celulosa, quitina y glucosaminoglucanos), 44f, 45-46,45f
Polisacáridos nutricionales (glucógeno y almidón), 44f, 45
Polisacáridos, 44-46
estructural (celulosa, quitina y glucosaminoglucanos), 44f, 45-46, 45f
nutricional (glucógeno y almidón), 44f, 45
Pollard, Thomas, 341
Porción de $F_0$ de ATP sintasa en la síntesis de ATP, 192-193, 193f
Porinas, 172, 172f
Portadores en transporte de electrones, 180-182, 181f
átomos de cobre, 180, 181f
citocromos, 180, 181f
flavoproteínas, 180, 181f
inhibidores para determinar la secuencia de, 182, 182f
proteínas hierro-azufre, 180, 181f
ubiquinona (UQ, *ubiquinone* o coenzima Q), 180, 181f
vías de tunelización de electrones, 182, 182f
Portadores tubulares vesiculares (VTC, *vesicular-tubular carriers*), 276, 276f
Porter, Keith, 297, 329
Portnoy, Daniel, 358EP
Potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*), 165
Potenciadores, 495
Potenciadores de empalme exónicos (ESE, *exonic splicing enhances*), 425, 427f
Potencial de acción, 160-161, 161f
formación de, 160-161, 161f
propagación de, como impulso, 161-162, 162f
Potencial de reposo, 159-160, 160f
Potencial de transferencia, 106, 107f
Potencial de transferencia de electrones, 179
Potencial de transferencia de fosfato, 106, 107f
Potenciales de membrana, 159-161
potencial de acción, 160-161, 161f
potencial de descanso, 159-160, 160f
Pott, Percival, 631
Potter, David, 251EP
Prasher, Douglas, 697
Precursor de MRNA. *Véase* Pre-mRNA (Mrna precursor)
Precursores de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP, *deoxyribonucleoside triphosphate precursors*), 729
Pre-mRNA (precursor de mRNA), 421
en empalme de RNA, 425f, 426f, 427f
procesamiento, 428f, 429f
síntesis y procesamiento de, 424f
Preparación de células rotas, 595-596
Pre-rRNA. *Véase* RNA prerribosomal (pre-rRNA)
Presecuencia, 304
Presentación del antígeno, en MHC, 672-675HP
Presión de turgor, 142, 142f
Prilosec, 154
Primasa, 520, 520f, 521, 521f, 529t
Primer ancestro común eucariótico, 26EP, 26EPf, 27EP
Primera ley de la termodinámica, 82-83
Primosoma, 521
Priones, 64HP, 249
Procariotas, 8-15
características que distinguen, 8-9f, 8-13
células eucariotas comparadas con, 9-13, 10t
cianobacterias, 14, 14f
conjugación en, 12, 12f
diversidad de, 14-15
dominio *Archaea*, 13-14
dominio Bacteria, 14
flagelo, 12, 13, 13f
inicio de la traducción en, 442-443, 443f
número y biomasa de, 15, 15t
tipos de, 13-15
Procaspasas, 622
Procentriolo, 556-557, 557f
Procesos endergónicos, 85
Procesos exergónicos, 85
Prochymal, 18HP
Producción de ATP en la glucólisis, 105-108, 106f, 107f
Profase
de la meiosis, 572f, 574-577, 574f
de la mitosis, 552, 553f, 554-558, 554
centrómeros, 556-558, 557f, 558f
cinetocoros, 555, 556, 556f
citoplasma, particionamiento de, 558, 559f
cromosoma mitótico, formación de, 552, 554-555, 554f, 555f
envoltura nuclear, disolución de, 558, 559f
huso mitótico, formación de, 556, 557-558, 557f, 558f
Progesterona, 47
Prolina, 50, 51f
Prometafase, de la mitosis, 553f, 559-560, 559f
Promotores, 408, 457, 495-496
*Proofreading*, 410, 525-526, 530, 534
Propio, distinguiendo de ajeno, 686-688
Proplastidios, 201
Propuesta de Watson-Crick, 374-377, 513, 513f, 518
Proteasomas, 509-510, 510f
Proteína B7, 670HP, 689
Proteína CD20, 655
Proteína CD28, 689
Proteína cinasa A (PKA *protein kinase A*), 600-602, 602f, 616, 618-619, 619f
Proteína cinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), 111

Proteína cinasa ATM, 643
Proteína cinasa ATR, 550, 551f
Proteína cinasa B (PKB, *protein kinase B*), 612-613, 612f, 619, 622, 646
Proteína cinasa C (PKC, *protein kinase C*), 597f, 598, 618f, 622
Proteína cinasa *SRC*, 235, 235f
Proteína de levadura Cdc2, 546EP, 547
Proteína de seguimiento del extremo (+ TIP), unión de, 326-327, 327f
Proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP, *cholesteryl ester transfer protein*), 303
Proteína de unión (BiP, *binding protein*), 68EP
Proteína de unión a TATA (TBP, *TATA-binding protein*), 418
Proteína del movimiento, 251
Proteína disulfuro isomerasa (PDI, *protein disulfide isomerase*), 270
Proteína fluorescente verde (GFP, *Green fluorescent protein*), 69EP, 260, 261, 262, 262f, 265, 265f, 266f, 276, 276f, 299EP, 697f
Proteína hemaglutinina (HA, *hemagglutinin*), 74, 74f
Proteína heterocromática 1 (HP1), 472
Proteína MCM, 527, 528f, 529t
Proteína MDM2, 643-644, 645f, 648f
Proteína PRB, 641, 642f
Proteína precursora amiloidea (APP, *amyloid precursor protein*), 64-65HP, 65HPf, 66HP, 733
Proteína Raf, 609
Proteína RecA, 579
Proteína receptora de cAMP (CRP, *cAMP receptor protein*), 459
Proteína reguladora de genes, 457
Proteína RhoA, 569, 570
Proteína Sic1, 548
Proteínas
- accesorio, 608-609
- factores de intercambio de nucleótidos de guanina, 608
- inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina, 608
- proteínas activadoras de GTPasa, 608
- vías Ras-MAP cinasa en, 608-609
- activación de GTPasa, 608
- adaptación y evolución, 76-77
- anclado a la cola, 271
- anclado por lípidos, 123f, 124, 125
- asociado a microtúbulos, 310, 313, 313f
- B7, 670HP, 689
- Bcl-2
- como oncogén cancerígeno, 623fn
- en apoptosis, 623, 624f
- bloques de construcción de, 48-53, 48f
- aminoácidos, estructuras de, 49-50, 49f, 51f
- cadenas laterales, propiedades de, 49f, 50-53, 51f
- cambios de conformación en dinámica, 58
- proteína de membrana integral, 128-130, 129f, 130f
- cambios dinámicos con, 58, 58f

cAMP
- proteína de unión a elementos de respuesta, 600, 601f
- proteína receptora, 459

captación de (*Véase* Captación postraduccional de proteínas)
captación postraduccional de, 304-307
en cloroplastos, 306-307, 306f
en mitocondrias, 304-306, 304fn, 305f
en peroxisomas, 304
caracterización de
- por cromatografía líquida en columna, 712-713
- por espectrometría de masas, 716-717, 717f
- por espectrometría, 716
- por PAGE, 715-716, 715f

CD20, 655
CD28, 689
choque térmico, 67EP, 68EP
codificación que afecta estado epigenético de la cromatina, 647
como transportador extracelular, 586
complejo multiproteico, 59-60, 59f
coprecipitación de, 714
cristalografía de rayos X, 58
cristales de proteínas de TCR adecuados para, 674EP
de la estructura de las proteínas integrales, 126f
estructuras en, en comparación con las proteínas, 58
desacoplamiento, 187
dominios, 57-58, 57f
en bicapa de lípidos, 117, 118f
en citoesqueleto
- proteínas de unión a actina, 351-353
- proteínas motoras, 315-319
- proteínas, 622

en el transporte de electrones
flavoproteínas, 180, 181f
- proteínas de hierro y azufre, 180, 181f

en la matriz de la pared celular, 255
en la superficie de los virus, 23-24, 24f
en la superficie del virus, 23-24, 24f
en retículo endoplásmico
- proteínas mal plegadas, destrucción de, 275, 275f
- transporte de proteínas a través, 268, 268fn

enlaces cruzados, 353
entregador de filamentos, 353
espectrometría de masas para identificar, 71-72, 71f
estabilidad de, determinación, 509-510, 510f
estructura cuaternaria de, 58-60, 59f
hemoglobina, estructura de, 59, 59f
interacciones proteína-proteína, 59-60, 59f, 60f
estructura de, determinando, 717-719
estructura primaria de, 53
estructura secundaria de, 53-54, 54f
estructura terciaria de, 55-58
cambios dinámicos con proteínas, 58, 58f
dominios de proteínas, 57-58, 57f
- mioglobina, 55f, 56, 57f
- similitudes entre las proteínas reveladas por, 56-57, 57f

fibroso, 56-57
fluorescente verde, 69EP, 260, 261, 262, 262f, 265, 265f, 266f, 276, 276f, 299EP, 697f
gen regulador, 457
globular, 57
GPCR (*Véase* Receptores acoplados a proteína G) (GPCR, *G protein-coupled receptors*)
GPI-anclado, 125
hemaglutinina, 74, 74f
heterocromático, 472
hierro-azufre, 180, 181f
homólogo, 76-77
identificados por espectrometría de masas, 71-72, 71f
IFT, 334HP
ingeniería, 73-76
- diseño de medicamentos basado en estructuras, 75-76
- nuevas proteínas, producción de, 74-75

integral, 123-125, 123f
- cambios de conformación en, identificación, 128-130, 129f, 130f
- estructura de, 126f
- glicoforina A, 127, 127f

interacciones entre proteínas de membrana y, 124, 124f
- patrones de movimiento de, 134-135, 135f
- proteínas de seguimiento del terminal, unión de, 326-327, 327f
- replicación de fractura por congelación, 124, 125f

levadura cdc2, 546EP, 547
límite de RNA, 352
lisosomal
no lisosomal, clasificación y transporte de, 286
- síntesis de, 268-270, 269f
- mal plegamiento, 62-67HP, 63HPf
- destrucción de, 275, 275f
- enfermedad de Alzheimer, 64-67HP, 64HPf
- enfermedad de Creutzfeld-Jakob, 62-64 HP

matriz de pared celular, 255
MCM, 527, 528f, 529t
MDM2, 643-644, 645f, 648f
medicamento dirigido a proteínas, desarrollo de, 75, 75f
medicamentos inhibidores de proteína para el cáncer, 656-658, 657t
membrana (*Véase* Proteínas de membrana)
membrana plasmática del eritrocito, 137, 138f
MHC, 672EP, 673EP, 684-685
motora, 315-319
- dineína, 317-319, 318f

en la telofase de la mitosis, 567, 568f
quinesina, 316-317, 316f, 319-320EP
resumen de, 315
movilidad, 133-136, 134f
control de la movilidad de la proteína de la membrana, 134-135, 135f
dominios de membrana y polaridad celular, 136, 136f
FRAP para medir la tasa de difusión, 133-134, 134f
movilidad de los lípidos de la membrana, 135-136, 135f
movimiento, 251
mutado, 655
no lisosomal, clasificación y transporte de, 286
nucleante, 352
nuevo, producción de, 74-75
para la replicación de *Escherichia coli*, 516, 529t
periférico, 123f, 124, 125
plegamiento, 60-62, 61f
chaperonas moleculares en, 62, 62f, 67-70EP
dinámico, 60-62
mal plegamiento, 62-67HP
vía de plegamiento, 61, 61f
vías alternativas, 61, 61f
pRB, 641, 642f
precursora amiloidea, 64-65HP, 65HPf, 66HP, 733
promotor del cáncer, actividad inhibidora de, 656-658
proteínas G (Véase Proteínas de unión a GTP (Proteínas G))
puentes cruzados, 335, 335f
purificación y caracterización de, por cromatografía, 712-713
Raf, 609
RecA, 579
relación de lípido a, 118
respuesta de proteína desplegada, 275, 275f
RhoA, 569, 570
secuencia de, en aminoácidos
en el plegamiento de proteínas, 61, 63HP, 63HPf
en la evolución y adaptación de proteínas, 76-77
en mutagénesis dirigida a sitio, 74-75
en enhebración, 61-62
estructura primaria correlacionada con, 56
estructura terciaria correlacionada con, 56, 57f,61
estructura tridimensional determinada por, 70HP
pronosticar, por secuenciación del genoma,71, 73
secuestro de monómeros, 352
señalización (*Véase* Proteínas de señalización)
síntesis en RER
de proteínas en ribosomas ligados a membrana *versus* ribosomas libres, 268
de proteínas integrales de membrana en ribosomas unidos a ER, 270-271, 271f
de proteínas secretoras, lisosomales o vacuola de planta, 268-270, 269f
procesamiento de proteínas recién sintetizadas, 270
SR, 428
subunidades de, 58-59
transferencia de éster de colesterilo, 303
transferencia de lípidos, 272, 272f
transmembrana, 123-124
unión a actina, 351-353
funciones de, 351-352, 352f
proteínas reguladoras, 352
proteínas de entrecruzamiento, 353
proteínas de unión a membrana, 353
proteínas de unión a monómeros, 353
proteínas despolimerizantes, 353
proteínas nucleantes, 352
proteínas que entregan filamentos, 353
proteínas secuestradoras de monómeros, 352
unión a monómero, 353
unión al $Ca^{2+}$, 615-616, 616f, 616t
unión de DNA de cadena sencilla, 521, 521f, 522f, 523f, 529f, 529t
unión, 68EP
vacuola de planta, 268-270, 269f
Proteínas accesorias, 608-609
factores de intercambio de nucleótidos de guanina, 608
inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina, 608
proteínas activadoras de GTPasa, 608
Proteínas activadoras de GTPasa (GAP, *GTPase-activating proteins*), 608
Proteínas ancladas a GPI, 125
Proteínas ancladas a la cola, 271
Proteínas ancladas a lípidos, 123f, 124, 125
Proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, *microtubule-associated proteins*), 310, 313, 313f
Proteínas Bcl-2
como oncogén cancerígeno, 623fn
en apoptosis, 623, 624f
Proteínas cinasas citoplasmáticas, oncogenes que
Proteínas cinasas, 109, 111
activación, en transducción de señal, 604
caspasa como objetivo, 622
citoplasmática, oncogén que codifica, 647
en el control del ciclo celular, 546-550
fosforilación/desfosforilación de Cdk, 547-548, 548f
inhibidores de Cdk, 548, 551-552, 551f
localización subcelular, 548-550, 549f
proteólisis controlada, 548
Src, 235, 235f
Proteínas de anclaje de PKA (AKAP, *PKA-anchoring proteins*), 601-602, 602f, 610
Proteínas de choque térmico (hsps, *heat shock proteins*), 67EP, 68EP
Proteínas de desacoplamiento (UCP, *uncoupling proteins*), 187
Proteínas de membrana, 123-126
clases de, 123-124, 123f
proteínas ancladas a lípidos, 123f, 124, 125
proteínas integrales, 123-125, 123f, 126f
proteínas periféricas, 123f, 124, 125
de membrana de eritrocitos, 137, 138f
difusión de
después de la fusión celular, 133, 133f
FRAP para medir las tasas de, 133-134, 134f
tasas de, FRAP para medir, 133-134, 134f
en bicapa lipídica, 117, 118, 118f
en bicapa lipídica de membrana, 117, 118f
interacción con los lípidos, 124, 124f
movilidad de (*Véase* Movilidad, proteínas y lípidos)
solubilización con detergentes, 126, 126f
unión a membrana, 353
Proteínas de nucleación, 352
Proteínas de señalización, 584, 585f. *Véase también* Proteínas de unión a GTP (proteínas G)
acciones de, 584, 585f
construcción de, 584
diversidad de, 606, 606f
interactuando con RTK activados, 605-607, 606f
enzimas de señalización, 607
factores de transcripción, 607
proteínas adaptadoras y proteínas de andamiaje, 606, 607f
mutaciones que alteran la estructura de, 594HP
sitios de unión para
cara citoplásmica de la membrana plasmática, 587-588
dominios PTB, 604-606, 605f, 606f, 612
dominios SH2, 604-606, 605f, 606f, 611-612, 611f
sitios de autofosforilación, 604, 606, 611-612
Proteínas de transferencia de lípidos, 272, 272f
Proteínas de unión a la actina, 351-353
funciones de, 351-352, 352f
proteínas de entrecruzamiento, 353
proteínas de unión a membrana, 353
proteínas de unión monoméricas, 353
proteínas despolimerizantes, 353
proteínas nucleantes, 352
proteínas que entregan filamentos, 353
proteínas reguladoras, 352
proteínas secuestradoras de monómeros, 352

Proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (SSB, *single-stranded DNA-binding proteins*), 521, 521f, 522f, 523f, 529f, 529t
Proteínas de unión a GTP (proteínas G), 77, 270
  descubrimiento y caracterización de, 590-593EP
  en la transducción de señal, 586, 587-589, 588f
  purificación de, 593EP
  resumen de, 588-589
  terminación de la respuesta, 589-590, 590f
  topología de, 587-588
  toxinas bacterianas, 590
Proteínas de unión a monómeros, 353
Proteínas de unión al calcio, 615-616, 616f, 616t
Proteínas del MHC, 672EP, 673EP, 684-685
Proteínas despolimerizantes, 353
Proteínas fibrosas, 56-57
Proteínas G. *Véase* Proteínas de unión a GTP (proteínas G)
Proteínas globulares, 57
Proteínas hierro-azufre, 180, 181f
Proteínas homólogas, 76-77
Proteínas IFT, 334HP
Proteínas integrales, 123-125, 123f
  cambios de conformación en, identificación, 128-130, 129f, 130f
  estructura de, 126f
  glicoforina A, 127, 127f
  interacciones entre proteínas de membrana y, 124, 124f
  patrones de movimiento de, 134-135, 135f
  replicación de fractura por congelación, 124, 125f
Proteínas lisosómicas
  no lisosómica, clasificación y transporte de, 286
  síntesis de, 268-270, 269f
Proteínas mal plegadas, 62-67HP. *Véanse también* Mal plegamiento de proteínas
  destrucción de, 275, 275f
Proteínas motoras, 315-319
  cinesina, 316-317, 316f, 319-320EP
  dineína, 317-319, 318f
  en la telofase de la mitosis, 567, 568f
  resumen de, 315
Proteínas mutadas, 655
Proteínas noveles, producción de, 74-75
Proteínas periféricas, 123f, 124, 125
Proteínas promotoras del cáncer, actividad inhibidora de, 656-658
Proteínas que entregan filamentos, 353
Proteínas que se unen a la membrana, 353
Proteínas Ras, 607-610. *Véase también* Vía Ras-MAP cinasa
Proteínas reguladoras, 352
Proteínas relacionadas con la cinesina (KRP, *kinesin-related protein*), 316-317, 317f
Proteínas secretoras, síntesis de, 268-270, 269f
Proteínas secuestradoras de monómeros, 352
Proteínas SR, 428
Proteínas transmembrana, 123-124
Proteínas vacuolares de plantas, 268-270, 269f,
Proteína-tirosina cinasas, 603-604
  no receptora, 604
  receptora, 604, 618f
Proteoglicano, 228-229, 228f
Proteólisis controlada, 548
Proteoma, 71, 72
Proteómica, 71-72
Protocélulas, 31
Protofilamentos, 312, 312f
Protones, 38-39, 39fn
Protooncogén, 638, 639, 639f
Protoplastos, 710, 711
Provirus, 24-25
Proyecto 1 000 genomas, 402HP
Proyecto Bea, 366
Proyecto ENCODE, 396
Proyecto Genoma Humano, 402, 730
Proyecto Internacional HapMap, 402HP
Prozac, 165
PrPC (*prion protein cellula*) proteína priónica celular, 63-64HP, 63HPf
Prueba de sangre OVA1, 72
Prusiner, Stanley, 63HP
PSA, 72
Pseudogenes, 391
Pubertad precoz, 594HPt, 595HP
Puentes cruzados, 313, 331, 335, 335f, 346, 347f, 348-350
Puentes cruzados de proteínas, 335, 335f
Puentes disulfuro, 50, 60
Pulso-caza, 260
Punto de control del ensamblaje del huso (SAC, *spindle assembly checkpoint*), 566-567, 566f
Punto de control cinasa Chk1, 550, 551f
Punto de control cinasa Chk2, 551, 551f
Punto de restricción, 547fn
Punto isoeléctrico, 712
Puntos calientes, 402HP, 580
Puntos de control, 550
  en el control del ciclo celular, 550-552, 551f
  punto de control del ensamblaje del huso, 566-567, 566f
  punto de control cinasa Chk1 (*checkpoint kinase*), 550, 551f
  punto de control cinasa Chk2, 551, 551f
Puntos de fusión de ácidos grasos comunes de 18 carbonos, 131, 131t
Purificación de MPF, 545-546EP
Purinas, 78, 78f, 373


## Q


Quiasmas/quiasma, 574f, 575
Quimioautótrofos, 200
Quimiocinas, 676-677
Quimioterapia, 628, 637, 644, 648, 653, 654, 655, 659
Quimotripsina, 94, 95f
Quinolonas, 102HP
Quitina, 44f, 45-46, 45f


## R


R grupos. *Véase* Cadenas laterales
Radiación gamma, 709
Radiación ionizante, 531, 534
Radiación ultravioleta (UV, *ultraviolet*), daño en el DNA a partir de, 535, 536-537HP
Radiación, como carcinógeno, 372, 384, 534, 535, 536HP, 537HP, 550-551
Radicales libres
  definido, 34
  envejecimiento y, 34-35HP
Radio hidrodinámico, 712
Radioisótopos, 709-710
  autorradiografía, 709-710
  propiedades de, 709t
  vida media ($t_{1/2}$) de, 709
Radón, 537HP
Raloxifeno, 631
Ramón y Cajal, Santiago, 1
Rango del huésped, 24
Rao, Potu, 542
Rasgos de la planta del guisante, 368t
Rastreo de partícula única (SPT, *single-particle tracking*), 134
Ratón MacBlue, 622f
Ratones genéticamente modificados, 34-35HP, 65-66HP
Ratones *knockout*, 735-736, 736f
Ratones NOD (*non-obese diabetic*), diabéticos no obesos, 669HP
Ratones transgénicos, 34-35HP, 65-66HP
Raymont, Ivan, 349
RDNA, 413
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*)
  amplificación del DNA para clonación o análisis, 728
  amplificación enzimática del DNA por, 726-728
  aplicaciones de, 728
  comparación de moléculas del DNA, 728
  cuantificación de plantillas para DNA o RNA, 728
  proceso de, 727-728, 727f
  prueba de presencia de secuencias específicas de DNA, 728
Reacciones de oxidación-reducción (redox), 103,179-180, 179f, 179t, 180fn
Reacciones dependientes de la luz, 203, 212f
Reacciones endergónicas, acoplamiento, 88
Reacciones endotérmicas, 83
Reacciones exergónicas, acoplamiento, 88
Reacciones exotérmicas, 83
Reacciones independientes de la luz, 203

Recaptación, 165 I-27
Receptor cinasa acoplado a proteína G (GRK, *G protein-coupled receptor kinase*), 589
Receptor de acetilcolina (ACh, *acetylcholine*), 147-151EP, 163, 164f. *Véase también* Receptor nicotínico acetilcolina (nAChR, *nicotinic acetylcholine receptor*)
Receptor de antígeno quimérico (CAR, *chimeric antigen receptor*), 655
Receptor de células B (BCR, *B-cell receptor*), 683-684, 689
Receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*), 655, 670HP, 675-676, 683-684, 685, 686, 688, 689
  célula T, 655, 670HP, 675-676, 683-684, 685, 686, 688, 689
  tipo toll, 663-664, 664f
Receptor de glucocorticoides (GR, *glucocorticoid receptor*), 494, 495f
Receptor del EGF (EGFR, *EGF receptor*), 658
Receptor nicotínico acetilcolina (nAChR, *nicotinic acetylcholine receptor*), 147-151EP
  cambios de conformación en, 150-151EP, 151EPf
  en micrografías electrónicas de membranas de órganos eléctricos, 149-150EP, 150EPf
  mapa de densidad electrónica de, 150EP, 150EPf
  SDS-PAGE después de la electroforesis, 148EP, 149EPf
Receptor NMDA, 165
Receptor proteína-tirosina cinasas (RTK, *receptor protein tyrosine kinases*), 586, 604
  transducción de señal por, 586
Receptor SRP, 269, 269f
Receptores, 6, 116
  acetilcolina nicotínicos, 147-151EP
    cambio de conformación en, 150-151EP, 151EPf
    en micrografías electrónicas de membranas de órganos eléctricos, 149-150EP, 150EPf
    mapa de densidad electrónica de, 150EP, 150EPf
    SDS-PAGE después de la electroforesis, 148EP, 149EPf
  acetilcolina, 147-151EP, 163, 164f
  adhesión celular, en señalización transmembrana, 245
  antígeno quimérico, 655
  cannabinoide, 165
  célula B, 683-684, 689
  EGF, 658
  en la transducción de señales
    por los GPCR, 587-588
    por receptores de células B y T, 586
    revisión de receptores en, 586
  en señalización celular, 583-584
  en señalización transmembrana, 245
  endocitosis, mediada por receptor, 294-296, 294f, 297-299EP
  GPCR (*Véase* Receptores acoplados a proteína G (GPCR, G protein-coupled receptor))
    como proteína-tirosina cinasa, 611
    diabetes *mellitus*, 613
    señalización por, 611-613
    sustratos, 611-612, 612f
    transporte de glucosa, 612-613, 612f
  insulina, señalización celular por, 611-613
  mensajeros extracelulares, 586
    aminoácidos y derivados de aminoácidos, 586
    eicosanoides, 586
    esteroides, 586
    gases, 586
  NMDA, 165
  odorante, 603
  polipéptidos y proteínas, 586
  reconocimiento de patrones, 663
  rianodina, 614
  siete dominios transmembrana (7TM), 587
  SRP, 269, 269f
Receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G protein-coupled receptors*)
  cAMP en amplificación de señal, 600
  cAMP en la movilización de glucosa, 600, 600 f, 601f
  en la percepción sensorial, 603
  en la regulación de glucosa en sangre, 599-602, 599f
  especificidad de, 599
  internalización mediada por arrestinas, 589-590, 590f
  respuestas hormonales mediadas por cAMP, 600-602, 601t
  transducción de señal por, 587-590
  trastornos asociados con, 594-595HP, 594HPt
  vías de transducción de señales cAMP, 600-602, 602f
Receptores cannabinoides (CB1, *cannabinoid receptors*), 165
Receptores de mantenimiento 301
Receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*), 663
Receptores de rianodina (RyRs, *ryanodine receptors*), 614
Receptores de siete dominios transmembrana (7TM), 587
Receptores odorantes, 603
Receptores tipo Toll (TLR, *toll like receptors*), 663-664, 664f
Rechazo al trasplante, 684, 688
Rechazo de injerto, 684
Recombinación genética, 371, 371f, 372f
  durante la meiosis, 572, 574, 575 579HP, 575f, 579-580, 579f
  en la reparación del DNA, 534
  evidencia visible de, 576f
  heterocromatina como inhibidor de, 469
  puntos calientes, 402HP, 580
Recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*), 534, 735
Recombinantes, 371
Recombinasa V(D)J, 681
Reconocimiento célula-célula, 237-238, 237f
Reconstrucción de partícula única, 718-719, 718f
Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*), 133-134, 134f, 698, 698f, 699f
Red del *cis* Golgi (CGN, *cis Golgi network*), 276, 277f, 278
Red del *trans* Golgi (TGN, *trans Golgi network*), 276, 277f, 285-286, 686
  clasificación y transporte de enzimas lisosomales, 285-286, 285f
  clasificación y transporte de proteínas no lisosomales, 286
  vesículas recubiertas de clatrina en, 286, 286f
  vía endocítica, 300-303, 301f
Red KMN, 566
Reduciendo la potencia, 109
Región promotora proximal, 493
Región T-DNA, 734
Regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity-determining regions*), 674-675EP
Regiones hipervariables, 670-680, 674EP, 675HPf, 683
Regiones no traducidas (UTR, *untranslated regions*), 505
Regulación a la baja del receptor, 300
Regulación metabólica, 109-110
  alteración de la actividad enzimática
  por modificación covalente, 109-110
  por modulación alostérica, 110
Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, *cystic fibrosis transmembrana conductance regulator*), 157-158HP, 157HPf
Relación masa/carga (m/z), 71, 71f
Reloj biogeológico de la Tierra, 9f
Reloj evolutivo, 27EP
Renaturalización, 384-387, 384f
Reordenamientos del DNA, 681-683, 682f, 683f
Reparación de desajuste (MMR, *mismatch repair*), 534
Reparación de la división de la base (BER, *base excision repair*), 532-534, 533f, 534f
Reparación de la división de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*), 532, 533f, 536HP
Repeticiones de trinucleótidos, 387-389HP, 388HPf
Reparación del DNA, 531-535
  deficiencias, consecuencias de, 536-537HP
  genes mutantes implicados en, 649

horquilla de replicación estancada y, 535-536, 535fn
reparación de la división de la base, 532-534, 533f, 534f
reparación de la división de nucleótidos, 532, 533f
reparación de la rotura de cadena doble, 534, 535f
reparación del desacople, 534
síntesis de translesión y, 535
xerodermia pigmentosa (XP, *xeroderma pigmentosum*) y, 535
Repeticiones en tándem, 384-386
Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), 435-436
Réplica, 706
Replicación bidireccional, 517, 517f
Replicación conservadora, 513, 514f
Replicación de *Escherichia coli*
hebras líderes y retardadas, 519-520, 519f, 520f
horquillas de replicación, 517, 518
horquilla de replicación eucariota, 528, 529-530,529f
origen de, 517
pinza β, 523, 524f, 529, 529t
problema de desenrollado, 518
proteínas requeridas para, 516, 529t
Replicación del DNA, 512-531. *Véase también* DNA polimerasas
bidireccional, 517, 517f
en células bacterianas, 516-520
en células eucariotas, 526-530
en virus, 526
esquemas alternativos de, 514f
estructura de la cromatina y, 530-531, 531f
experimento de Meselson-Stahl, 513-515, 515f
fidelidad durante, 523-526, 525f
origen de, 517
propuesta de Watson-Crick, 513, 513f, 518
resumen de, 513
semiconservativa, 513-515, 514f, 515f
semidiscontinua, 519-520, 519f
Replicación dispersa, 513, 514f
Replicación mediante congelación y fractura, 124, 125f, 246, 247f, 705, 706, 706f
Replicación semiconservativa, 513-515, 514f, 515f
Replicación semidiscontinua, 519-520, 519f, 520f
Replicones, 526-527
Replisoma, 522, 523f, 528, 529f
Represión por catabolito, 459, 459f
Represión transcripcional, 400f, 499-502
impresión genómica, 501-502
lncRNA como represores, 502, 502f
metilación del DNA, 500-501, 501f
Represor, 457
Represores transcripcionales, 488
Reproducción de células, 5, 5f
Reprogramación celular directa, enzimas en, 21HP
Residuos, 50
Resolución, en microscopio óptico, 694, 694f
Respuesta a proteína desplegada (UPR, *unfolded protein response*), 275, 275f
Respuesta de choque térmico, 67-68EP
Respuesta inmune, 661-691
activación de linfocitos por señales de superficie celular, 689
activación y mecanismo de acción de células T, 675-678
anticuerpos, estructura modular de, 678-681
complejo mayor de histocompatibilidad, 672-675HP, 684-686
complejos receptores de antígeno unido a la membrana, 683-684
distinción entre propio y ajeno, 686-688
enfermedades autoinmunes, 668-671HP
reordenamientos del DNA que producen genes que codifican receptores de antígeno de células B y T, 681-683
resumen de, 662-665
inmunidad, 662
respuestas inmunes adaptativas, 665
respuestas inmunes innatas, 663-665, 665f
sistema inmune, 662-663, 662f
teoría de la selección clonal aplicada a las células B, 666-668, 666f
vacunación, 671
vías de transducción de señal en activación de linfocito, 689-691
Respuestas inmunes adaptativas, 665
Respuestas inmunes innatas, 663-665, 665f
Restricción calórica y longevidad, 111-112HP
Retículo endoplásmico (ER, *Endoplasmic reticulum*), 8f, 9f, 10, 10t, 11f, 27EP, 257, 265-276
asimetría de, 271, 271f
biosíntesis de membrana en, 271-272, 272f, 273f
complejo de Golgi, 276-284, 277f
ERAD, 275
partición durante la mitosis, 558
proteínas mal plegadas, destrucción de, 275, 275f
resumen de, 265
retículo endoplásmico liso, 265-267, 267f
retículo endoplásmico rugoso, 265-266, 266f, 267-271, 267f
señales de exportación, 281, 283
subcompartimentos, 265-271
transporte de proteínas a través, 268, 268fn
Retículo endoplásmico liso (SER, *smooth endoplasmic reticulum*), 265-267, 267f
funciones de, 266-267
Retículo endoplásmico rugoso (RER, *rough endoplasmic reticulum*) 265-266, 267-271, 267f
células secretoras, 267-268, 267f
cisterna, 265-266, 266f
funciones de, 268-271
glucosilación en, 273-274, 273f, 274f
síntesis
de proteína de membrana integral en ribosoma unido a ER, 270-271, 271f
de proteínas en ribosomas ligados a membrana *versus* ribosomas libres, 268
de secretor, lisosomal, o proteínas de planta vacuolar, 268-270, 269f
procesamiento de proteínas recién sintetizadas, 270
Retículo sarcoplásmico (SR, *sarcoplasmic reticulum*), 267, 350 351, 350f
Retinoblastoma, 640-641, 641f
Retrotransposones, 392-393, 393f
Retrovirus, 393, 607, 631, 732
Revel, Jean Paul, 252EP
RFC, 529, 529f, 529t
Rho, 411
Ribointerruptores, 459-460
Ribonucleasa
autoensamblaje de, 60
modelo de cinta de, 54, 55f
plegado de, 60-61, 61f
Ribonucleasa P, 416
Ribonucleoproteínas
nuclear pequeña (snRNP), 426, 427f, 428, 428f
nucleolar pequeña (snoRNP), 415
Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, *small nuclear ribonucleoproteins*), 426, 427f, 428, 428f
Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP, *small nucleolar ribonucleoproteins*), 415
Ribonucleótidos monofosfatos, 77
Ribosa, 77, 77f, 373fn, 414, 415
metilada, 415, 416f, 423, 424f
Ribosomas
composición macromolecular de mamífero, 413, 413f
en el inicio de la traducción, 444-445, 444f
síntesis de proteínas en ribosomas ligados a membrana *versus* ribosomas libres, 268
unido a ER, síntesis de proteína de membrana integral en, 270-271, 271f
Ribozima Hammerhead, 78, 78f
Ribozimas, 78, 78f, 90
descubrimiento de, 425
nueva creación, en laboratorio, 429-430
Ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP, *ribulose 1,5-bisphosphate*), 213-214, 214f

Ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco, *Ribulose bisphosphate carboxylase oxygena*), 214-216, 214f, 216f
Rienhoff, Hugh, 366, 367
Ringer, Sydney, 350
Riñones
  cáncer, 640t, 642f
  enfermedades renales poliquísticas (PKD, *polycystic kidney diseases*), 334HP, 334HPf
  fallo por diabetes, 224
RISC, 431
Ritonavir, 99
Ritossa, F. M., 67EP
Rituxan, 655
RNA, 77-78, 77f, 78f
  5S rRNA, 415-416
  antisentido, 436
  aplicaciones clínicas de, 432-433HP
  CRISPR (crRNA), 435-436
  de cadena doble (dsRNA, *double-stranded*), 430-431
  de origen natural, 429
  guía simple (sgRNA, *single-guide RNA*), 435-436
  interacción piwi (piRNA, *piwi-interacting*), 407, 435
  interferencia (RNAi, *interference*), 265, 265f, 430-432, 430f, 736-737, 737f
  meiótico no codificante (meiRNA, *noncoding meiotic*), 574
  mensajero (mRNA, *messenger RNA*), 406-407, 407f
  microRNA (miRNA), 407, 431f, 434-435, 434f
    en control traslacional, 508-509, 508f, 509f
    en el cáncer, 649
    en genética del cáncer, 649
  mRNA comparado, 420, 421f
  no codificación larga (lncRNA, *long noncoding*), 502, 502f
  no codificación (ncRNA, *noncoding*), 435-436
  nuclear heterogéneo (hnRNA, *heterogeneous nuclear*), 417, 417f
  en empalme de RNA, 426
  nuclear pequeño (snRNA, *small nuclear*), 407, 426, 427f
  nucleolar pequeño (snoRNA, *small nucleolar*), 407, 415, 416f
  pequeña interferencia (siRNA, *small interfering RNA*), 72, 265, 407, 431, 431f, 432-433HP, 432fn, 736-737
  plantillas, cuantificación, 728
  prerribosomal (pre-rRNA), 413-416
  procesamiento, en células eucariotas, 411-412, 412f
  ribosomal (rRNA) (*Véase* RNA ribosomal (rRNA))
  secuenciación, 485, 487-488, 487f
  trans (tRNA) (*Véase* RNA trans (tRNA, trans RNA))
  transcripción primaria (pre-RNA), 412
  transporte, 465
  *XIST*, 470
RNA antisentido, 436
RNA asociado a Piwi (piRNA, *Piwi-interacting RNA*), 407, 435
RNA de doble cadena (dsRNA, *double-stranded RNA*), 430-431
RNA de una sola guía (sgRNA, *single-guide RNA*), 435-436
RNA meiótico no codificante (meiRNA, *noncoding meiotic RNA*), 574
RNA mensajero (mRNA, *messenger RNA*), 406-407, 407f
  como catalizador, 450-453EP, 451f, 452f
  descubrimiento de, 406
  estructura de, 419-420, 420f
  hnRNA comparados con, 420, 421f
  localización citoplasmática de, 506, 507f
  ovomucoide, procesamiento, 428, 429f
  polirribosomas, 449-450, 449f
  pre-mRNA (*Véase* Pre-mRNA (mRNA precursor))
  procesamiento de, 423-429, 424f
  5′ capas y cola de poli (A) en 3′, 423, 424, 424f
    empalme de ARN, 425-429
    síntesis de, 417-419
    formación de hnRNA, 417, 417f
  transcripción de mRNA, maquinaria para, 417-419, 418f, 419f
  vigilancia y control de calidad, 448-449
RNA no codificante (ncRNA, *noncoding RNA*), 435-436
RNA no codificante largo (lncRNA, *long noncoding RNA*), 502, 502f
RNA nuclear heterogéneo (hnRNA, *heterogeneous nuclear RNA*), 417, 417f
  en empalme de RNA, 426
  mRNA comparados con, 420, 421f
RNA nuclear pequeño (snRNA, *small nuclear RNA*), 407, 426, 427f
RNA nucleolar pequeño (snoRNA, *small nucleolar RNA*), 407, 415, 416f
RNA pequeño de interferencia (siRNA, *small interfering RNA*), 72, 265, 407, 431, 431f, 432-433HP, 432fn, 736-737
RNA polimerasa, 408-410, 409f, 410f, 520, 523-524, 532, 533f
RNA polimerasas dependientes de DNA. *Véase* RNA polimerasa
RNA prerribosomal (pre-rRNA, *preribosomal RNA*)
  función de los snoRNA en, 415, 416f
  resumen de, 413-414
  síntesis y procesamiento de, 413-415, 414f
RNA ribosomal (rRNA, *ribosomal RNA*), 407, 407f
  nucléolo, 413, 413f
  pre-rRNA (*Véase* RNA prerribosomal (pre-rRNA))
  síntesis y procesamiento de, 413-416, 414f
    5SrRNA, 415-416
    pre-rRNA, 413-415, 414f
  tRNA, 416, 416f
RNA sentido, 436
RNA *trans* (RNAt, *trans RNA*), 407
  carga, 441-442, 441f
  en decodificación de codones, 439-442
  en elongación
  liberación de tRNA desacilado, 447-448
  selección de aminoacil-tRNA, 445
  estructura de, 439-441, 439f, 440f
  síntesis y procesamiento de, 416, 416f
RNA *XIST*, 470
Roberts, Richard, 420
Robertson, J. D., 115
Robustez de las células, 6
Rodbell, Martin, 591EP, 592EP
Rosenbaum, Joel, 331
Rosenthal, Alan, 672EP
Roth, Thomas, 297
Rothman, James, 279
Roturas de cadena doble (DSB, *double-stranded breaks*), 534, 535f, 737
Rous, Peyton, 632-633EP
RPA, 529, 529f, 529t
RRNA. *Véase* RNA ribosomal (rRNA)
Ruben, Samuel, 202-203
Rubisco, 67-70EP
Ruderman, Joan, 545EP
Ruvkun, Gary, 433-434


## S


*S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA, *methicillin-resistant S. aureus*), 101HP, 102HP
Sabor (gusto), 603
*Saccharomyces cerevisiae*, 16, 17f, 28EP, 72, 546
Sakmann, Bert, 143
*Salmonella*, 13f, 29EP
Sanger, Frederick, 728-729
Sarcoma de Kaposi, 594HP, 631
Sarcómeros, 346, 347f
Sarín, 114
Schenk, Dale, 65HP
*Schizosaccharomyces pombe*, 546
Schleiden, Matthias, 2-3
Schwann, Theodor, 3
Secado de punto crítico, 708
Sección, 695
Secreción constitutiva, 259
Secreción regulada, 259
Secuencia
  de insulina, 53, 53f
  genomas, 394-396
  no sinónima, 437
  RNA, 485, 487-488, 487f
  secuencia de aminoácidos de las proteínas
    en el plegamiento de proteínas, 61, 63HP, 63HPf
    en la evolución y adaptación de proteínas, 76-77
    en mutagénesis dirigida a sitio, 74-75

en enhebración, 61-62
estructura primaria correlacionada con, 56
estructura terciaria correlacionada con, 56, 57f, 61
estructura tridimensional determinada por, 70HP
pronosticar, por secuenciación del genoma, 71, 73
secuencias intermedias, 420
sinónima, 437
variación de secuencia de DNA, 398-399
Secuencia *Alu*, 393-394
Secuencia de consenso, 411
Secuencia de señal, 268
Secuencia de Shine-Dalgarno, 506
Secuencia sinónima, 437
Secuenciación de RNA (RNA-Seq, *RNA sequencing*), 485, 487-488, 487f
Secuenciación del DNA, 728-730, 729f
Secuenciación del genoma, 222, 223
Secuenciación genómica y Proyecto de Detección de Trastornos en Recién Nacidos, 402-403HP
Secuenciación masiva paralela (secuenciación de segunda generación), 730
Secuenciación no sinónima, 437
Secuenciación Sanger-Coulson, 728-729
Secuenciadores de tercera generación, 730
Secuencias de intervención, 420, 421f, 422f
Secuencias de replicación autónoma (ARS, *autonomous replicating sequences*), 527, 528f
Secuencias de tetranucleótidos, 731
Secuestro de carbono, 219-220HP
Securina, 562
Segunda ley de la termodinámica, 83-84
Segundos mensajeros, 584, 595-598
cAMP como, 595-596, 595f
descubrimiento de, 595, 596
en amplificación de señal, 600
en la movilización de glucosa en sangre, 600, 600f, 601f
formación de, 595, 595f
respuestas hormonales mediadas por, 600-602, 601t
vías de transducción de señales, 600-602,602f
diacilglicerol, 597f, 598
fosfatidilinositol derivado, 596-597, 596f, 597f
fosfolipasa C, 597-598, 597f
inositol 1,4,5-trifosfato, 597f, 598, 598t
Segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol, 596-597, 596f, 597f
diacilglicerol, 597f, 598
fosfolipasa C, 597-598, 597f
inositol 1,4,5-trifosfato, 597f, 598, 598t
Selección negativa, 669HP, 687-688, 688f
Selección positiva, 688, 688f
Selectinas, 238-239, 238f
Selinger, Zvi, 592-593EP
Semagacestat, 66HP
Semipermeable, 141
Senescencia, 550, 638
Señal coestimuladora, 689
Señal de dileucina ácida, 299EP
Señal de exportación nuclear (NES, *nuclear export signal*), 465, 548
Señal de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal)*, 462, 463-465, 464f
Señal de orientación peroxisomal (PTS, *peroxisomal targeting signal*), 304
Señal YXX φ, 299EP
Señales de clasificación, 260
Señales de exportación
ER, 281, 283
nuclear (NES), 465, 548
Señales de superficie celular, linfocitos activados por, 689
Señalización autocrina, 583, 583f
Señalización celular
definido, 583
elementos básicos de, 583-586
mensajeros extracelulares en, 583-584, 583f, 584f, 586
para comprometer a la célula a la autodestrucción, 621-624
en apoptosis, 621-624
en necroptosis, 624
para mantener la supervivencia celular, 624-625
por receptor de insulina, 611-613
señalización autocrina, 583, 583f
señalización endocrina, 583, 583f
señalización paracrina, 583, 583f
vías (*Véase* Vías de señalización)
Señalización endocrina, 583, 583f
Señalización paracrina, 583, 583f
Señalización transmembrana, 245
Separasa, 562
Sharp, Phillip, 420
Shimomura, Osamu, 697
Siekevitz, Philip, 263
Sigler, Paul, 68EP
Sildenafilo, 620
Silenciamiento de RNA, 431
Silenciamiento, gen, 734-738
ingeniería de nucleasas en, 737-738, 738f
interferencia de RNA, 736-737, 737f
mutagénesis *in vitro*, 735
ratones *knockout*, 735-736, 736f
Silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, *posttranscriptional gene silencing*), 430
Simporte, 156, 156f
Simulaciones de dinámica molecular (MD, *molecular dynamic*), 58
Sinapsis, *162-165*
acciones de medicamentos en, 165
definido, 162-163
plasticidad sináptica, 165
uniones neuromusculares, 163, 163f
Sinapsis electrotónica, 251EP
Sinapsis inmunológica, 685
Síndrome de Alport, 228
Síndrome de Bardet-Biedl (BBS, *Bardet-Biedl syndrome*), 334HP
Síndrome de Cockayne (CS, *Cockayne syndrome*), 536HP
Síndrome de Down (trisomía 21), 479HP
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS, *acquired immune deficiency syndrome*), 23, 102HP, 526, 678
células T auxiliares y, 678
resistencia, 595-596HP, 678, 684, 685
resistencia a los medicamentos, 74, 101-102HP
terapias para, 433HP
Síndrome de Klinefelter, 578HP
Síndrome de Li-Fraumeni, 642
Síndrome de Prader-Willi (PWS, *Prader-Willi syndrome*), 501
Síndrome de QT largo, 20HP
Síndrome de Usher, 240
Síndrome de Zellweger (ZS, *Zellweger syndrome*), 196-197HP
Síndrome X frágil, 389HPf
Síndromes de Ehler-Danlos, 227
Síntesis
de los mRNA, 417-419
formación de hnRNA, 417, 417f
transcripción de mRNA, maquinaria para, 417-419, 418f, 419f
ER rugoso en
procesamiento de proteínas recién sintetizadas, 270
síntesis de proteínas en membrana *versus* ribosomas libres, 268
síntesis de proteínas integrales de membrana en ribosomas unidos a ER, 270-271, 271f
síntesis de proteínas secretoras, lisosomales o vacuolares de planta, 268-270, 269f
Síntesis de ATP
anillo *c* oligomérico de, 188, 189, 189f
definido, 188
en metabolismo, 104, 104f
estructura de, 187-189, 189f
maquinaria para, 188, 188f
mecanismo de cambio de enlace para, 189-192, 191f
porción de $F_0$ de, 188, 189f, 192-193, 193f
Síntesis de carbohidratos, 213-219
control redox, 215-216, 215f
en plantas $C_3$, 213-217, 214f
en plantas $C_4$, 218-219, 218f
en plantas CAM, 219
fotorrespiración, 216-217, 216f, 217f
peroxisomas, 217
Síntesis de translesión (TLS, *translesion synthesis*), 535
Síntesis química del DNA, 722-723
Sistema
cerrado *versus* abierto, 89
definido, 83
energía de, 83, 83f
entornos de, 83, 83f, 84, 85, 89
entropía de, 83-84, 84f, 85, 94
Sistema abierto, 89
Sistema cerrado, 89

Sistema de dos híbridos de levadura, 714-715, 714f
Sistema endomembranoso
citoplasma, 258, 258f
endomembranas (*Véase* Endomembranas, estudio de)
organelos, 258-260, 259f
resumen de, 258-260
retículo endoplásmico (*Véase* Retículo endoplásmico (ER, endoplasmic reticulum))
vía biosintética, 258, 258f
vía endocítica, 258f, 259
vía secretora, 258-259, 258f
Sistema inmune, 662-663, 662f
Sistema libre de células, 263, 264f, 712
Sitio A (aminoacilo), 444f, 445
Sitio activo de enzimas, 92-93, 93f
Sitio alostérico, 110, 110f
Sitio E (*exit*) de salida, 444f, 445
Sitio P (peptidilo), 444f, 445
Sitios de acoplamiento, 183
Sitios de autofosforilación, 604, 606, 611-612
Sitios de empalme, 525
Sitios de unión de cationes, 153f
Skou, Jens, 152-153
Slevin, P. R., 320EP
Smith, Dennis, 544EP
Smithies, Oliver, 735
SNAP-25, 288, 289, 289f, 290f
SNAREs, 288-290, 289f, 290f
S-nitrosilación, 621
Solanezumab, 66
Solubilización de proteínas de membrana con detergentes, 126, 126f
Solución hipertónica (hiperosmótica), 141-142, 141f, 142f, 157HP
Solución hipotónica (hipoosmótica), 137, 141-142, 141f, 142f
Solución isotónica (isosmótica), 141f, 142
Somavert, 75
Song, Ok-kyu, 714
Sordera, mutaciones de miosina y, 344
Southern blot, 722, 722f
Spudich, J. A., 319EP
*SRC*-homología 2 (SH2, *SRC-homology 2*), 604-606, 605f, 606f
Stahl, Franklin, 513-515, 515f
Stanley, Wendell, 23
*Staphylococcus aureus*, 101HP
START, 547
Stehelin, Dominique, 633EP
Steitz, Thomas, 453EPf
*Stentor coeruleus*, 21
Steward, Frederick, 483
STIM1, 615, 616f
STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*), Microscopia de reconstrucción óptica estocástica, 700
Subcompartimentos de retículo endoplásmico, 265-271
Subunidades
de iones de potasio activados por voltaje, 145, 146f
de proteínas, 58-59
ribosomal, ensamblaje de, 78, 79, 79f
subunidades de canales iónicos, hélice/hélices en
dominios de, 145, 146f
subunidades de canal KcsA, 145, 145f
subunidades de canal Kv, 145-146, 146f
Subunidades ribosomales, ensamblaje de, 78, 79, 79f
Succinato deshidrogenasa (complejo II), 185
Sumner, James, 90
Superenrollamiento, 381-382, 382f
Superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF, *immunoglobulin superfamily*), 238f, 239, 665
Superfamilias de moléculas, 76
Supergrupos, 28EPf
Superóxido dismutasa (SOD, *superoxide dismutase*), 34HP
Sustratos
definido, 90
inducción de tensión en el sustrato, 94-96, 95f
orientación del sustrato, 94, 94f
reactividad del sustrato cambiante, 94, 95f
Sustratos de receptor de insulina (IRS, *insulin receptor substrates*), 611-612, 612f
Sutherland, Earl, 590EP
Sutton, Walter, 369, 370
SV40, 382f, 463, 528, 631, 641
Svoboda, Karel, 319EP


## T


TALEN, 737
Tallo periférico, 192
Tamoxifeno, 631
TAP tag, 72, 73, 713
Tasa de crecimiento, de células cancerígenas, 629, 629f
Tasa de mutación espontánea, 524
Taxol, 310
Taylor, J. Herbert, 514-515
Técnicas de grabado profundo, 707, 707f
Tejido conectivo, 233
Tejido epitelial, 233
Tejidos linfoides, 648, 662f, 667, 668, 738
Telofase
de la meiosis, 572f, 577
de la mitosis, 553f, 567-571, 567f
Telomerasa, 475, 476f
Telómeros, 473, 475-477, 475f, 476f, 574, 575f
Temin, Howard, 633EP
Temperatura de fusión (Tm, *melting temperature*), 384
Temperatura de transición, 131
Temperatura no permisiva (restrictiva), 516
Temperatura permisiva, 516
Teoría celular, 2-3
Teoría de la selección clonal aplicada a las células B,
Teoría de tetranucleótidos, 374, 378EP, 380EP
Teoría del anillo contráctil, 568, 569f
Teoría endosimbiótica, 26EP, 27EP
Teprotide, 99
Terapéutica regenerativa, 540
Terapia con bacteriófagos, 25
Terapia de genes 25, 158HP, 197HP, 732
Terapia de reducción de sustrato, 288HP
Terapia de reemplazo celular, 17-21 HP
células madre adultas, 18HP, 18HPf
células madre embrionarias, 18-19 HP, 19HPf
células madre pluripotentes inducidas, 19-21 HP, 20HPf
reprogramación celular directa, 21HP
Terapia de reemplazo de enzimas, 287HP
Terapias dirigidas, 654
Teratoma, 19HP, 20HP
Terminación, traslacional, 448, 448f
Terminal 5′ (5-terminal principal), 374, 374f
Termodinámica
de la transformación de agua-hielo, 85t
definido, 82
leyes de, 82-84
primera ley de la termodinámica, 82-83
segunda ley de la termodinámica, 83-84
Testosterona, 47, 47f, 632
Tétanos, 671
Tethering, 288, 289f
Tétrada, 574f, 575, 576
*Tetrahymena thermophila*, 425-426, 450-451EP, 451EPf
Tetrosas, 42
TFIID, 418
TFIIH, 532, 533f, 536HP
Thale cress, 17f
Theriot, Julie, 358-359EP
*Thermus thermophilus*, 453EPf
Enhebrar, 61-62
*Thymus*, 231f, 662, 662f, 665, 666f, 669HP, 671HP, 686, 688, 688f
Tilacoides, 202, 202f
Tilghman, Shirley, 421
Till, James, 18HP
Tilney, Lew, 358EP
Timina (T, *thymine*), 78, 78f, 373
Tinción de Feulgen, 695, 695f
Tinción negativa, 705, 705f
Tipo salvaje, 370
Tipranavir, 99
Tir71, 69EP
TIRF (*total internal reflection fluorescence*), fluorescencia de reflexión interna total, 134
Tiroiditis, 669 HP
Tirosina cinasa *SRC*, 690
Tirosina cinasa Tec, 690
Tirosina cinasas, 75-76, 75f, 690
Tolerancia a la lactosa, 402HP
Tolerancia, inmunológico, 668, 670HP, 678
Tomografía crioelectrónica (crio-ET, *cryoelectron tomography*), 704-705
Tonegawa, Susumu, 681
Tonoplasto, 293

Topoisomerasa, 381-382, 383f, 518, 528, 529f, 529t
Topoisomerasas tipo I, 382
Topoisomerasas tipo II, 382
*Torpedo marmarota*, 148EP, 148EPf, 150EPf
Tos ferina, 399
Toxina de Coley, 654
Toxinas bacterianas en proteínas de unión a GTP, 590
Toxoide, 671
Traducción, 407
  elongación, 445-448
  formación de enlaces peptídicos, 445, 446
  liberación de tRNA desacilado, 447-448
  representación esquemática de, 446f
  selección de aminoacil-tRNA, 445
  terminación, 448, 448f
  translocación, 446-447, 447f
  inicio de, 442-445
  en eucariotas, 443-444, 443f
  en procariotas, 442-443, 443f
  ribosomas en, función de, 444-445, 444f
Transcripción, 406
  de mRNA, maquinaria para, 417-419, 418f, 419f
  elongación de la cadena durante la transcripción, 408, 409f
  en bacterias, 410-411, 410f
  en células procariotas y eucariotas, 410-412, 412f
  RNA polimerasas en, 408-410, 409f, 410f
  sitios del DNA implicados en la regulación, 492-494, 492f, 493f
Transcripción primaria (pre-RNA), 412
Transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*), 102HP, 392-393, 526, 633EP
Transcriptoma, 436
Transducción de energía
  definida, 82
  ejemplos de, 82f
  en membranas plasmáticas, 116
Transducción, 82, 82f, 732
Transducción de señal, 116
  cAMP, 600-602, 602f
  en activación de linfocitos, 689-691
  encuesta de receptores en, 586
  fosfolipasa C en, 597-598
  fosforilación de proteína-tirosina en, 603-607
    activación de proteína cinasa, 604
    dimerización del receptor, 604
    interacciones proteína-proteína dependientes de la fosfotirosina, 604
    respuesta final, 607
    vías de señalización corriente abajo, activación de, 604, 606-607
  por canales activados por ligando, 586
  por esteroides, 586
  por los GPCR, 586, 587-590
  procesos fisiológicos mediados por, 587t
  proteínas de unión a GTP, 586, 588-589
  receptores, 587-588
  terminación de la respuesta, 589-590
  toxinas bacterianas, 590
  por los RTK, 586
  por receptores de células B y T, 586
Transducina, 603
Transfección, 732-733
Transferencia de energía de resonancia Förster (FRET, *Förster resonance energy transfer*), 697-698, 698f
Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*), 69-70EP, 129, 697-698, 698f
Transferencia de genes laterales, 29EP
Transferencia de northern, 722
Transferencia génica horizontal (HGT, *horizontal gene transfer*), 29EP
Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *somatic cell nuclear transfer)*, 19HP, 19HPf
Transformación bacteriana, 378-379EP, 379EPf
Transformación de T-DNA, 734
Transformaciones espontáneas de energía, 85-87
Transgén, 733
Transición epitelial-mesenquimal (EMT, e*phitelial mesenchymal transition*), 240
Translocación cotraduccional, 268
Translocaciones, 446-447, 447f, 478-479HP, 479f
Translocasa de nucleótidos de adenina (ANT, *adenine nucleotide translocase*), 193
Translocón, 269-270, 269f
Transmisión sináptica, 162-165, 163f
  secuencia de eventos durante, 164, 164f
Transportador de dopamina (DAT, *dopamine transporter*), 165
Transportador facilitador, 151, 156f
Transportadores de casete de unión a ATP (ABC, *ATP-binding cassette*), 155, 157-158HP
Transporte
  activo (*Véase* Transporte activo)
  de solutos, en membranas plasmáticas, 116
  de sustancias a través de las membranas celulares, 32
Transporte activo, 152-156
  defectos en, como causa de la enfermedad hereditaria, 157 158HP, 158HPt
  energía lumínica para, 155
  primario, 152-155
  bomba de sodio y potasio, 153-154, 153f,154f
  bombas tipo P, 153-154
  bombas tipo V, 154-155
  otros sistemas de transporte, 154-155
  transportadores ABC, 155, 157-158HP
  transporte acoplado a la hidrólisis del ATP, 152-154
  secundario (o cotransporte), acople del transporte a gradientes existentes de iones, 155-156, 156f
Transporte activo primario, 152-155
  bomba de sodio y potasio, 153-154, 153f, 154f
  bombas tipo P, 153-154
  bombas tipo V, 154-155
  otros sistemas de transporte, 154-155
  transportadores ABC, 155, 157-158HP
  transporte acoplado a la hidrólisis de ATP, 152-154
Transporte activo secundario, 155-156, 156f
Transporte axonal, 314-315, 314f, 315f
Transporte de electrones
  cadena, 180-182, 182f
  complejos, 182-186, 183f
  complejo I (NADH deshidrogenasa), 184-185, 184f
  complejo II (succinato deshidrogenasa), 185
  complejo III (citocromo bc1), 185
  complejo IV (citocromo c oxidasa), 185-186, 186f
  en la fotosíntesis, 211-212, 212f
  portadores, 180-182, 181f
  átomos de cobre, 180, 181f
  citocromos, 180, 181f
  flavoproteínas, 180, 181f
  inhibidores para determinar la secuencia de, 182, 182f
  proteínas hierro-azufre, 180, 181f
  ubiquinona (UQ, o coenzima Q), 180, 181f
    vías de tunelización de electrones, 182, 182f
Transporte de organelos mediado por quinesina, 317, 317f
Transporte intraflagelar (IFT, i*ntraflagellar transport*), 331, 332f, 333-334HP
Transporte nucleocitoplásmico, 462-465
Transporte vesicular en el complejo de Golgi, 278-285, 280f
  brote de vesículas, 263, 264f, 288, 296f, 301f
  dirigiendo vesículas a compartimiento particular, 288-290, 289f
  fusión de vesículas, 264, 264f, 288, 289-290, 290f
  modelo de transporte vesicular, 278-279, 280f
  SNARE, 288-290, 289f, 290f
  tipos de, 280-284 (*Véase también* Vesículas recubiertas)
Transposición, 391-392, 392f
Transposones, 392-393, 392f, 393f
Transtiretina (TTR, *transthyretin*), 433HP
Trasplante de médula ósea, 18HP, 197HP, 242HP
Trastornos de reparación del DNA, 536-537HP
Trastornos del habla y del lenguaje, 397

Trastornos del sistema nervioso, 195-197HP, 338, 387-389HP, 669HP, 671HP
Trastornos por depósito lisosomal, 287HP, 287HPf, 287HPt
Tratamiento autólogo, 18HP
Triacilglicerol, 46, 46f, 47
Tricotiodistrofia (TTD, *trichothiodystrophy*), 536 HP
Trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*), 78
Trifosfato de desoxiadenosina (dATP, *deoxyadenosine triphosphate*), 373fn, 374f, 518, 729f
Trifosfato de desoxicitidina (dCTP, *deoxycytidine triphosphate*), 373 fn, 518, 729, 729f, 732f
Trifosfato de desoxiguanosina (dGTP, *deoxyguanosine triphosphate*), 373fn, 518, 729f, 732f
Trifosfato de desoxitimidina (dTTP, *deoxythymidine triphosphate*), 373fn, 518, 729f
Trifosfato de guanosina (GTP, *guanosine triphosphate*), 77
 dímeros, 325, 326f
 hidrólisis, 325-326
 para ensamblaje de microtúbulos, 325-326, 326f
 proteínas de unión a GTP (proteínas G), 270
Triosas, 42
Trisomía, 577-579HP, 578HPf
Tritón X-100, 148EP, 149EPf
tRNA desacilado, 447-448
TRNA. *Véase* RNA *trans* (tRNA)
Trofectodermo, 735
Tropomiosina, 137, 138f, 348, 348f, 351, 351f
TSH (*thyroid-stimulating hormone*), hormona estimulante de la tiroides, 591EP, 594HP, 601, 601t
Tsien, Roger, 614, 697
T-SNARE, 288, 289f, 290f
Tuberculosis, 303
Túbulos transversales (T, *transverse*), 350, 350f
TUG, 612
Tumores
 benigno, 638, 644, 650
 células de origen de, 636-637, 637f
 crecimiento de, 630, 637, 651, 659, 659f
 formación de, 630fn, 636, 639, 646fn, 651
 maligno, 628, 636-637, 637f, 644
Tumores benignos, 638, 644, 650
Tumores malignos, 628, 636-637, 637f, 644
 células de origen de, 636-637, 637f
Tumorogénesis, 636
Túneles de nanotubos, 249-250, 250f
Tysabri, 671HP

## U

Ubiquinona (UQ, o coenzima Q), 180, 181f
Ubiquitina ligasas, 548
Ubiquitina, 300, 300fn, 301, 510
UGGT, 274, 274f
Último ancestro común eucariótico (LECA, *last eukaryotic common ancestor*), 26EPf, 27EP, 28EPf
Último ancestro común universal (LUCA, *last universal common ancestor*), 7
Ultracentrifugación, separación de ácidos nucleicos por, 719-721, 721f
Umbral, 160-162, 161f, 164
Unidad de transcripción, 412
Unidad fotosintética, 205, 206
Unión de extremos no homólogos (NHEJ, *nonhomologous end joining*), 534, 535f
Unión gap, 247-250, 248f
Unión sintélica, 559f, 566
Uniones adherentes, 244-245, 244f, 245f
Uniones de Holliday, 580
Uniones de las crestas, 170
Uniones estrechas, 244f, 245-247, 246f, 247f
Uniones neuromusculares, 148f, 163, 163f, 165, 350, 350f
Unwin, Nigel, 150EP
Uracilo, 78, 78f
Urey, Harold, 31-32
Uyeda, T. Q., 319EP

## V

Vacuna Aβ, 65-66HP
Vacuna contra células T, 670HP
Vacunación, 671
Vacunas de células B, 671
Vacuolas
 célula de planta, 292-293, 293f
 síntesis de, 268-270, 269f
Vacuolizaciones, 63HP
Vaina de mielina
 composición de, en lípidos de membrana, 118, 118f
 función de, 159, 159f, 162, 162f
Vale, Ronald, 316
Valproato, 67HP
Van Niel, C. B., 202, 203
Vane, John, 99
Variación en el número de copias (CNV, *copy number variation*), 399-400, 536
Variantes de nucleótido único (SNV, *single-nucleotide variants*), 399
Variantes estructurales, 399, 399f
Varmus, Harold, 633EP
Vasopresina, 594HPf, 594HPt, 598, 598f, 601, 601t
VCAM (*vascular cell adhesion molecule*), molécula de adhesión de células vasculares 238f, 239
Vectibix, 655
VEGF, 433HP, 659-660
Velocidad de la reacción, 97, 97f, 98
Velocidad de sedimentación, 720, 721f
Velocidad de sedimentación (tasa-zona), 720, 721f
Velocidad inicial, 97-98
Velocidad máxima ($V_{máx}$), 98
Veneno de serpiente, 233
Venenos, citoesqueleto y, 309, 310
Venter, J. Craig, 22
Vermurafenib, 657, 657f
Vesícula germinal, 543EP
Vesículas recubiertas, 281-284, 281f
 estudios de, 297-299EP
 fosfoinosítidos en la regulación de, 296, 297f
Vesículas recubiertas con COPI, 281, 281f, 283f, 284
Vesículas recubiertas con COPII, 281-283, 281f, 282f, 283f
Vesículas recubiertas de clatrina, 281, 282f
 dinamina en formación de, 296, 296f
 en la red del trans Golgi, 286, 286f
Vesículas sinápticas, 118f, 163, 163f, 164, 164f
Vía anaeróbica, 106
Vía biosintética, 258, 258f
Vía C4, 218
Vía de Notch, 66HP
Vía de transcripción acoplada, 532
Vía endocítica, 258f, 259, 300-303, 301f
Vía extrínseca de la apoptosis, 622-623,623f
Vía genómica global, 532
Vía intrínseca en la apoptosis, 623-624, 624f
Vía JAK-STAT, 690
Vía paracelular, 245, 246f
Vía Ras-MAP cinasa, 607-610
 adaptación, transmitir información, 610, 610f
 proteínas accesorias, 608-609
Vía secretora, 258-259, 258f
Vía TGF-beta, 366, 367
Viagra, 620
Vías anabólicas, 103, 110-111
Vías catabólicas, 103, 110-111, 175, 176f
Vías de señalización
 complejidad de, 617-618
 convergencia en, 618, 618f, 619f
 corriente abajo, activación de, 604, 606-607
 de la apoptosis, 621-624
  vía extrínseca, 622-623, 623f
  vía intrínseca, 623-624, 624f
 definido, 584
 diafonía en, 618, 618f, 619f
 divergencia en, 618, 618f
 en plantas, 613
 resumen de, 583, 584f
 vía ras-MAP cinasa, 607-610
Vías de túneles de electrones, 182, 182f
Vías metabólicas, 41, 103
Vida media ($t_{1/2}$), 709
Virchow, Rudolf, 3
Virión, 23
Viroide, 25
Viruela bovina, 671
Viruela, 671
Virus, 23-25
 beneficios de, 25
 cápsides de, 23, 24f
 especificidad de la célula huésped, cambio en, 24

infecciones virales, tipos de, 24-25, 25f
oncogén y, 632-635EP
propiedades de, 23
proteína en la superficie de, 23-24, 24f
rango del huésped de, 24
replicación del DNA en, 526
resistencia a, interferón y, 676
respuesta inmune innata a, 663-665, 665f
tratamiento con RNAi, 432-433HP
Virus 1918, 24
Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, *lymphocytic choriomeningitis virus*), 672EP
Virus de la eritroblastosis aviar, 647
Virus de la estomatitis vesicular (VSV, *vesicular stomatitis virus*), 261, 262f
Virus de la hepatitis B, 631
Virus de la hepatitis C, 664
Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), 23, 24f, 25, 25f, 102HP, 433HP
azidotimidina (AZT) y, 526
células TH y, 678
Virus de tumores de RNA, 631, 632EPf, 633-634EP, 635EP, 638, 646
Virus del Ébola, 661, 662
Virus del herpes (HHV-8, *herpes virus*), 631
Virus del mosaico del tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*), 23, 23f, 79
Virus del papiloma humano (HPV, *human papilloma virus*), 631
Virus del sarcoma aviar (ASV, *avian sarcoma virus*), 633EP, 638
Virus del sarcoma Harvey, 635EP
Virus del simio 40 (SV40, *simian virus 40*), 382f, 463, 528, 631, 641
Virus Epstein-Barr, 631
Virus tumorales de DNA, 631, 635EP, 641
Visibilidad, en microscopio óptico, 695
Visión, 601, 603
V-SNARE, 288, 289f, 290f

## W

Walker, John, 190
Wang, James, 381-382
Wasserman, William, 544EP
Watson, James, 373, 374-377, 513, 513f, 518
Weinberg, Robert, 635EP
Weinert, Ted, 550
Weisenberg, Richard, 325
Weismann, August, 369
Welch, Matthew, 359EP
Western blot, 715-716, 739
Wikström, Mårten, 184f
Wiley, Don, 673EP, 674EP
Williams, Robley, 79
Wilmot, Ian, 483
Wilson, Ian, 673EP, 674EP
Woese, Carl, 27EP
Wu, Michael, 545EP
Wylie, Andrew, 622

## X

XDR (*extremely drug resistant),* extremadamente resistente a los medicamentos, 100HP
Xerodermia pigmentaria (XP, *xeroderma pigmentosum*), 535, 536HP

## Y

Yanagida, Toshio, 319EP
Yildiz, A., 320EP
Yonath, Ada, 453EPf
Yoshida, Masasuke, 190

## Z

Zacharias, E., 378EP
Zelboraf, 657, 657f
Zevalin, 655
Zigoteno, 574, 574f, 575
Zinkernagel, Rolf, 672EP
*Zonula occludens*. *Véase* Uniones estrechas
Zucchini, 435
α-D-glucosa, 42, 42f
α-hélice
como conformación, 54, 127fn
descripción de, 54, 54f
en glicoforina, 127, 127f
en hemaglutinina, 74, 74f
en mioglobina, 56, 57f
en queratina, 54
en receptor de acetilcolina, 150EP, 150EPf
regiones de, 54, 55f
superficie de, 54

Aβ piranosa, 43, 43f
Aβ42, 64-66HP, 65HPf
β-lactamasa, 102HP
β-secretasa, 64HP, 65HPf, 66HP
γ-secretasa, 64-65HP, 65HPf, 66HP
γ-tubulina, 322-323, 323f